

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202090431 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.03.16

(51) Int. Cl. C07K 14/54 (2006.01)  
A61K 47/60 (2017.01)  
A61K 47/54 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.08.03

---

(54) МУТЕИНЫ ИНТЕРЛЕЙКИНА-21 И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

---

(31) 62/540,692; 62/616,733

(32) 2017.08.03; 2018.01.12

(33) US

(86) PCT/US2018/045105

(87) WO 2019/028316 2019.02.07

(71) Заявитель:  
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Али Халед М.К.З., Агравал Нирадж  
Джагдиш, Каннан Гунасекаран,  
Фолтц Ян, Ван Чжулунь, Бейтс Дарен,  
Мок Марисса, Такенака Сунсеке (US)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении предусмотрены мутеины IL-21 и слитые белки, содержащие их, для применения в способах лечения заболевания. Также в изобретении предусмотрены соответствующие конъюгаты, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева, фармацевтические композиции и наборы. В настоящем изобретении предусмотрены способы получения мутеинов IL-21 и слитых белков, содержащих их, а также способы лечения субъекта, нуждающегося в этом. Дополнительно предусмотрены антигенсвязывающие белки для PD-1.

A1

202090431

202090431

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-561202EA/032

### МУТЕИНЫ ИНТЕРЛЕЙКИНА-21 И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящим заявляется приоритет согласно §119(e) раздела 35 U.S.C. по предварительной заявке на патент США № 62/540692, поданной 3 августа 2017 года, и по предварительной заявке на патент США № 62/616733, поданной 12 января 2018 года, и их раскрытие настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

#### ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛА, ПОДАННОГО В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, включенный посредством ссылки во всей своей полноте, подается одновременно с настоящей заявкой и обозначен следующим образом: ASCII-файл (текстовый) размером 975000 байт под названием "51633\_Seqlisting.txt," созданный 25 июля 2018 года.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Сигнальная ось PD-1/PD-L1 участвует в подавлении Т-клеточных иммунных ответов при раке. Антагонисты данного пути прошли клиническую валидацию при ряде показаний, представляющих собой солидные опухоли. Ниволумаб и пембролизумаб являются двумя такими ингибиторами, которые нацеливаются на путь PD-1, и каждый из них был одобрен Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) для лечения метастатической меланомы. Недавно исследователи протестировали парадигму ингибирования контрольных точек при других типах опухолей. Хотя были достигнуты некоторые успехи, терапия путем ингибирования контрольных точек все еще остается в тени других вариантов лечения рака.

Исследования ингибиторов контрольных точек в комбинации с другими средствами проводятся в настоящее время или недавно были завершены. Комбинацию ниволумаба и ипилимумаба, антитела, блокирующего рецептор CTLA-4, например, тестировали в клиническом испытании фазы III с участием пациентов с неоперабельной меланомой III или IV стадии. В данном исследовании процентная доля пациентов, достигших полного ответа, была наивысшей среди тех, кто получал комбинацию ниволумаба и ипилимумаба, что превосходит результат, продемонстрированный в группе, получавшей одно из двух лекарственных средств отдельно. Другие комбинации также в настоящее время исследуются.

Интерлейкин-21 (IL-21) представляет собой Т-клеточный плеiotропный цитокин, который регулирует активность клеток как врожденной, так и адаптивной иммунной системы. IL-21 может повышать выживаемость и эффекторную функцию Т-клеток. Поскольку он играет ключевую роль в противоопухолевых и противовирусных ответах, в дополнение к тому, что он оказывает значительные эффекты на воспалительные ответы, которые приводят к развитию аутоиммунных заболеваний и воспалительных заболеваний, IL-21 был привлекательной мишенью для нескольких терапевтических средств.

Однако, разработка терапевтических средств на основе IL-21 была сложной. Изучение было осложнено исследованиями, демонстрирующими, что усиление или, наоборот, ингибирование действия IL-21 приводит к терапевтическому эффекту. Дополнительные проблемы существуют из-за широкой экспрессии рецептора IL-21 (IL-21R). IL-21R экспрессируется не только на поверхности Т-клеток, но также на поверхности В-клеток, НК-клеток и миелоидных клеток. Соответственно, необходимо позаботиться о том, чтобы ограничить широкую активацию IL-21 в лейкоцитах и избежать потенциальной токсичности. Ограничение передачи сигнала с помощью IL-21 должно быть сбалансированным и селективным. Запуск эффектов IL-21 необходимо предусмотреть так, чтобы он происходил в нужное время и в нужном месте.

В действительности любой успех, особенно клинический успех с фрагментами IL-21 в качестве монотерапии или в комбинации с ингибиторами контрольных точек, был сдержанным. Таким образом, остается необходимость в применении способов лечения с помощью IL-21, в том числе способов с комбинацией фрагментов IL-21 и ингибиторов контрольных точек. Также остается необходимость в комбинации терапевтических средств на основе IL-21 с ингибированием контрольных точек иммунного ответа.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ**

В настоящем изобретении предусмотрены мутеины IL-21, содержащие аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, где SEQ ID NO: 2 представляет собой

QGQDX HMXXM XXXXX XVDXL KNXVN DLVPE FLPAP EDVET NCEWS AFSCF QKAQL KSANT GNNEX XIXXX XXXLX XXXXX TNAGR RQKHR LTCPS CDSYE KKPPK EFLXX FXXLL XXMXX QHXSS RTHGS EDS (SEQ ID NO: 2), и X представляет собой любую аминокислоту, и где аминокислотная последовательность мутеина IL-21 отличается от аминокислотной последовательности IL-21 человека (SEQ ID NO: 1) по меньшей мере 1 аминокислотой.

Таким образом, в одном аспекте в настоящем изобретении также предусмотрены мутеины IL-21, содержащие только одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 дикого типа, которая предусмотрена в данном документе под SEQ ID NO: 1. В иллюстративных аспектах аминокислотная замена находится в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 65, 66, 68, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 109, 110, 112, 113, 116, 117, 119, 120 или 123 в соответствии с нумерацией аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены мутеины IL-21, содержащие только две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 1. В иллюстративных аспектах аминокислотные замены находятся в двух аминокислотных положениях, выбранных из группы, состоящей из 5, 9, 15, 70, 71, 72, 73 и 76 в соответствии с нумерацией аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1.

В иллюстративных вариантах осуществления мутеины IL-21 связываются с

рецептором IL-21 (IL-21R) со сниженной аффинностью по сравнению с аффинностью IL-21 дикого типа к рецептору IL-21. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 связывается с IL-21R человека с  $K_D$ , которая превышает или равняется приблизительно 0,04 нМ. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 связывается с IL-21R яванского макака с  $K_D$ , которая превышает или равняется приблизительно 0,055 нМ.

В настоящем изобретении также предусмотрены конъюгаты, содержащие мутеин IL-21 по настоящему изобретению, связанный с гетерологичным фрагментом. В иллюстративных аспектах гетерологичный фрагмент представляет собой полипептид, так что конъюгат представляет собой слитый белок. Следовательно, в настоящем изобретении предусмотрены слитые белки, содержащие мутеин IL-21 по настоящему изобретению. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мутеин IL-21 по настоящему изобретению, связанный с антигенсвязывающим белком, таким как антитело или его антигенсвязывающий фрагмент антитела.

В конкретных вариантах осуществления слитый белок содержит мутеин IL-21, связанный с антигенсвязывающим белком для PD-1 (например, антигенсвязывающим антителом к PD-1) по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также предусмотрены антигенсвязывающие белки для PD-1, а также конъюгаты и слитые белки, содержащие антигенсвязывающий белок для PD-1.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую мутеин IL-21, антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антигенсвязывающее антитело к PD-1) или слитый белок, содержащий мутеин IL-21 и антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антигенсвязывающее антитело к PD-1) по настоящему изобретению. В иллюстративных аспектах молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую конъюгат или слитый белок по настоящему изобретению. Кроме того, в данном документе предусмотрены векторы, содержащие нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению, и клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены наборы, содержащие мутеин IL-21, антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антигенсвязывающее антитело к PD-1), конъюгат, слитый белок (например, слитый белок, содержащий мутеин IL-21 и антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антигенсвязывающее антитело к PD-1)), нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина по настоящему изобретению или их комбинацию.

В данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие мутеин IL-21, антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антигенсвязывающее антитело к PD-1), конъюгат, слитый белок (например, слитый белок, содержащий мутеин IL-21 и антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антигенсвязывающее антитело к PD-1)), нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина по настоящему изобретению или



их комбинацию.

В данном документе предусмотрены способы получения мутеина IL-21, антигенсвязывающего белка для PD-1 (например, антигенсвязывающего антитела к PD-1) и слитого белка, содержащего мутеин IL-21 и антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антигенсвязывающее антитело к PD-1). В иллюстративных вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению для экспрессии мутеина IL-21, антигенсвязывающего белка для PD-1 (например, антигенсвязывающего антитела к PD-1) или слитого белка, содержащего мутеин IL-21 и антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антигенсвязывающее антитело к PD-1), и сбор экспрессирующегося мутеина IL-21, антигенсвязывающего белка для PD-1 (например, антигенсвязывающего антитела к PD-1) или слитого белка, содержащего мутеин IL-21 и антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антигенсвязывающее антитело к PD-1).

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы лечения. В иллюстративных вариантах осуществления способ представляет собой способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по настоящему изобретению в количестве, эффективном для лечения субъекта. В иллюстративных аспектах субъект имеет опухоль (например, солидную опухоль, гемобластоз или лимфолейкоз), и фармацевтическую композицию вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения опухоли у субъекта. В других иллюстративных аспектах опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) (например, NSCLC III или IV стадии), мелкоклеточный рак легкого (SCLC), рак головы и шеи, рак почки, рак молочной железы, меланому, рак яичника, рак печени, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак предстательной железы, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатоцеллюлярную карциному, виды рака с высокой микросателлитной нестабильностью (т. е. виды рака с высокой MSI), лимфому или лейкоз.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

На фигуре 1A представлен график зависимости объема опухоли (мм<sup>3</sup>) от времени (дней) у мышей линии BALB/c, которым имплантировали клетки CT26/3E5 карциномы толстой кишки. В день 12 опухоли измеряли, и мышам вводили внутрибрюшинную (IP) инъекцию 300 мкг антитела изотипического контроля (mIgG1) в дни 12, 15 и 18.

На фигуре 1B представлен график зависимости объема опухоли (мм<sup>3</sup>) от времени (дней) у мышей линии BALB/c, которым имплантировали клетки CT26/3E5 карциномы толстой кишки. В день 12 опухоли измеряли, и мышам вводили IP-инъекцию 300 мкг антитела к PD-1 в дни 12, 15 и 18.

На фигуре 1C представлен график зависимости объема опухоли (мм<sup>3</sup>) от времени (дней) у мышей линии BALB/c, которым имплантировали клетки CT26/3E5 карциномы толстой кишки. В день 12 опухоли измеряли, и мышам вводили 50 мкг рекомбинантного IL-21 мыши (gmIL-21) три раза в неделю в течение 3 недель. Введение доз завершали в день 33.

На фигуре 1D представлен график зависимости объема опухоли (мм<sup>3</sup>) от времени (дней) у мышей линии BALB/c, которым имплантировали клетки CT26/3E5 карциномы толстой кишки. В день 12 опухоли измеряли, и мышам вводили 300 мкг антитела к PD-1 в дни 12, 15 и 18 и 50 мкг gmIL-21 три раза в неделю в течение 3 недель. Введение доз завершали в день 33.

На фигуре 2 представлен график процентной выживаемости четырех групп мышей линии BALB/c, которым имплантировали клетки CT26/3E5 карциномы толстой кишки. Мышам группы 1 вводили внутрибрюшинную (IP) инъекцию 300 мкг антитела изотипического контроля (mIgG1) в дни 12, 15 и 18. Мышам группы 2 вводили IP-инъекцию 300 мкг антитела к PD-1 в дни 12, 15 и 18. Мышам группы 3 вводили 50 мкг gmIL-21 три раза в неделю в течение 3 недель. Мышам группы 4 вводили 300 мкг антитела к PD-1 в дни 12, 15 и 18 и 50 мкг gmIL-21 три раза в неделю в течение 3 недель. Введение комбинации антитела к PD-1 и gmIL-21 в значительной степени увеличивает выживаемость по сравнению с монотерапией с помощью gmIL-21 или антитела к PD-1.

Фигура 3 представляет собой иллюстрацию гипотетического механизма действия слитого белка, содержащего блокирующее антитело к PD-1, слитое с мутеином IL-21 ( $\alpha$ PD-1:мутеин IL-21). Без ограничения конкретной теорией полагают, что слитый белок связывается с IL-21R на поверхности CD8<sup>+</sup> Т-клеток, одновременно блокируя передачу сигнала между PD-1 и PD-L1.

Фигура 4A представляет собой иллюстрацию слитого белка, содержащего антитело к PD-1, слитое с гомодимером мутеина IL-21. Слитый белок не имеет линкера. Антитело может содержать константные области, которые снижают или устраняют ассоциированные с Fc связывание и эффекторные функции (например, не обладают способностью к взаимодействию с Fc $\gamma$ -рецепторами (например, SEFL2-2)).

Фигура 4B представляет собой иллюстрацию слитого белка, содержащего антитело к PD-1, слитое с гомодимером мутеина IL-21. Слитый белок может содержать линкер GGGGS (G4S) между константной областью тяжелой цепи антитела и мутеином IL-21. Антитело может также содержать модификации SEFL2-2.

Фигура 4C представляет собой иллюстрацию слитого белка, содержащего антитело к PD-1, слитое с мономером мутеина IL-21. Слитый белок может содержать линкер G4S между константной областью тяжелой цепи антитела и мутеином IL-21. Тяжелые цепи антитела содержат мутации с заменой пар заряженных аминокислот (срм; например, V1, V4, V103 или V131), способствующие преимущественной ассоциации гетеродимерных Fc-областей. Антитело может также содержать модификации SEFL2-2.

На фигуре 5A представлен график передачи сигнала с помощью STAT3 в Т-клетках Hut78 PD-1<sup>ve</sup>, подвергнутых воздействию (i) рекомбинантного IL-21 человека (rhIL-21) отдельно (сплошная линия с закрашенными кругами), (ii) антитела mAb к PD-1 отдельно (сплошная линия с закрашенными ромбами), (iii) антитела mAb к PD-1, слитого с гомодимером IL-21, без линкера (сплошная линия с закрашенными треугольниками), (iv) антитела mAb к PD-1, слитого с гомодимером IL-21, с линкером (штриховая пунктирная

линия с незакрашенными треугольниками), (v) антитела mAb к PD-1, слитого с мономером IL-21, без линкера (сплошная линия с закрашенными квадратами) или (vi) антитела mAb к PD-1, слитого с мономером IL-21, с линкером (штриховая пунктирная линия с незакрашенными квадратами).

На фигуре 5B представлен график передачи сигнала с помощью STAT3 в Т-клетках Hut78 PD-1<sup>+ve</sup>, подвергнутых воздействию (i) рекомбинантного IL-21 человека (rhIL-21) отдельно (сплошная линия с закрашенными кругами), (ii) антитела mAb к PD-1 отдельно (сплошная линия с закрашенными ромбами), (iii) антитела mAb к PD-1, слитого с гомодимером IL-21, без линкера (сплошная линия с закрашенными треугольниками), (iv) антитела mAb к PD-1, слитого с гомодимером IL-21, с линкером (штриховая пунктирная линия с незакрашенными треугольниками), (v) антитела mAb к PD-1, слитого с мономером IL-21, без линкера (сплошная линия с закрашенными квадратами) или (vi) антитела mAb к PD-1, слитого с мономером IL-21, с линкером (штриховая пунктирная линия с незакрашенными квадратами).

На фигуре 6 представлен график изменения концентраций в сыворотке крови слитого белка на основе гомодимера, содержащего IL-21 WT, слитый с антителом mAb к PD-1, который внутривенно вводили 6 животным в низкой дозе (250 мкг/кг) либо в высокой дозе (1000 мкг/кг). Домен антитела IgG (150 мкг/кг) анализировали в качестве контроля.

На фигуре 7 представлен график кратности снижения активности IL-21 (относительно активности rhIL-21) в клетках Hut78 PD-1<sup>-ve</sup> (незакрашенные столбцы) или клетках Hut78 PD-1<sup>+ve</sup> (закрашенные столбцы), подвергнутых воздействию мутеинов IL-21 со сниженной аффинностью к IL-21R $\alpha$ .

На фигуре 8 представлен график кратности снижения активности IL-21 (относительно активности rhIL-21) в клетках Hut78 PD-1<sup>-ve</sup> (незакрашенные столбцы) или клетках Hut78 PD-1<sup>+ve</sup> (закрашенные столбцы), подвергнутых воздействию мутеинов IL-21 со сниженной аффинностью к IL-21R $\gamma$ .

На фигуре 9A представлен график передачи сигнала с помощью STAT3 в Т-клетках Hut78 PD-1<sup>-ve</sup>, подвергнутых воздействию (i) рекомбинантного IL-21 человека (rhIL-21) отдельно (сплошная линия с закрашенными кругами), (ii) антитела mAb к PD-1, слитого с гомодимером IL-21 WT (штриховая пунктирная линия с незакрашенными кругами), (iii) антитела mAb к PD-1, слитого с мономером IL-21 WT (штриховая пунктирная линия с закрашенными кругами), и (iv) антитела mAb к PD-1, слитого с гомодимером мутеина 51 IL-21 (R65P) (точечная пунктирная линия с закрашенными треугольниками).

На фигуре 9B представлен график передачи сигнала с помощью STAT3 в Т-клетках Hut78 PD-1<sup>+ve</sup>, подвергнутых воздействию (i) рекомбинантного IL-21 человека (rhIL-21) отдельно (сплошная линия с закрашенными кругами), (ii) антитела mAb к PD-1, слитого с гомодимером IL-21 WT (штриховая пунктирная линия с незакрашенными кругами), (iii) антитела mAb к PD-1, слитого с мономером IL-21 WT (штриховая пунктирная линия с закрашенными кругами), и (iv) антитела mAb к PD-1, слитого с гомодимером мутеина 51 IL-21 (R65P) (точечная пунктирная линия с закрашенными треугольниками).

На фигуре 10 представлен график изменения концентраций в сыворотке крови слитого белка, содержащего (i) антитело mAb к PD-1, слитое с гомодимером мутеина IL-21 R76E (точечная пунктирная линия с закрашенными кругами), (ii) антитело mAb к PD-1, слитое с гомодимером мутеина IL-21 R76A (штриховая пунктирная линия с закрашенными треугольниками), (iii) антитело mAb к PD-1, слитое с гомодимером мутеина IL-21 D15N (штриховая пунктирная линия с X), (iv) антитело к PD-1 (8,25 мг/кг; штриховая пунктирная линия с незакрашенными ромбами) и (v) антитело mAb к PD-1, слитое с гомодимером мутеина IL-21 WT (сплошная линия с закрашенными квадратами).

На фигуре 11 представлен график зависимости концентрации IL-2 (пг/мл), секретируемого клетками в реакции смешанной культуры лимфоцитов, от концентрации антитела для (i) антитела к PD-1 (сплошная линия с закрашенными кругами), (ii) слитого белка, содержащего гомодимер двойного мутеина IL-21 R5Q/R76E (штриховая пунктирная линия с незакрашенными кругами), (iii) комбинации антитела mAb к PD-1 и rhIL-21 (точечная пунктирная линия с незакрашенными квадратами), (iv) слитого белка, содержащего гомодимер одинарного мутеина IL-21 R76E (закрашенные квадраты), (v) контрольного IgG (точечная пунктирная линия с незакрашенными ромбами) и (vi) rhIL-21 (прерывистая линия с незакрашенными треугольниками).

На фигуре 12A представлен график зависимости сравнительной кратности изменения активности STAT3 по средней интенсивности флуоресценции (MFI) в клетках, подвергнутых воздействию (i) слитого белка, содержащего двойной мутеин IL-21 R5E/R76A (линия с незакрашенными треугольниками), (ii) контрольного IgG1 (точечная пунктирная линия с закрашенными ромбами), (iii) rhIL-21 (штриховая пунктирная линия с незакрашенными квадратами), (iv) антитела mAb к PD-1 (сплошная линия с незакрашенными овалами), (v) комбинации rhIL-21 и антитела mAb к PD-1 (штриховая пунктирная линия с закрашенными овалами) или (vi) слитого белка, содержащего одинарный мутеин IL-21 R76E (линия с незакрашенными ромбами).

На фигуре 12B представлен график зависимости сравнительной кратности изменения активности STAT3 по MFI в клетках, подвергнутых воздействию (i) слитого белка, содержащего двойной мутеин IL-21 R5Q/R76E (линия с незакрашенными треугольниками), (ii) контрольного IgG1 (точечная пунктирная линия с закрашенными ромбами), (iii) rhIL-21 (штриховая пунктирная линия с незакрашенными квадратами), (iv) антитела mAb к PD-1 (сплошная линия с незакрашенными овалами), (v) комбинации rhIL-21 и антитела mAb к PD-1 (штриховая пунктирная линия с закрашенными овалами) или (vi) слитого белка, содержащего одинарный мутеин IL-21 R76E (линия с незакрашенными ромбами).

На фигуре 12C представлен график зависимости сравнительной кратности изменения активности STAT3 по MFI в клетках, подвергнутых воздействию (i) слитого белка, содержащего двойной мутеин IL-21 R9E/R76A (линия с незакрашенными треугольниками), (ii) контрольного IgG1 (точечная пунктирная линия с закрашенными ромбами), (iii) rhIL-21 (штриховая пунктирная линия с незакрашенными квадратами), (iv)

антитела mAb к PD-1 (сплошная линия с незакрашенными овалами), (v) комбинации rhIL-21 и антитела mAb к PD-1 (штриховая пунктирная линия с закрашенными овалами) или (vi) слитого белка, содержащего одинарный мутеин IL-21 R76E (линия с незакрашенными ромбами).

На фигуре 13А представлен график зависимости % специфического лизиса, опосредованного CTL (ось y), от соотношений эффекторных клеток и клеток-мишеней (ось x) при воздействии (i) rhIL-21 (сплошная линия с закрашенными кругами), (ii) контрольного антитела hIgG4 (штриховая пунктирная линия с незакрашенными кругами), (iii) антитела mAb к PD-1 (штриховая пунктирная линия с закрашенными треугольниками), (iv) комбинации rhIL-21 и антитела mAb к PD-1 (точечная пунктирная линия с незакрашенными треугольниками) или (v) слитого белка, содержащего IL-21 R5E/R76A (прерывистая линия с X).

На фигуре 13В представлен график % специфического лизиса, опосредованного CTL, при воздействии (i) rhIL-21 (сплошная линия с закрашенными кругами), (ii) контрольного антитела hIgG4 (штриховая пунктирная линия с незакрашенными кругами), (iii) антитела mAb к PD-1 (штриховая пунктирная линия с закрашенными треугольниками), (iv) комбинации rhIL-21 и антитела mAb к PD-1 (точечная пунктирная линия с незакрашенными треугольниками) или (v) слитого белка, содержащего IL-21 R5Q/R76E (прерывистая линия с X).

На фигуре 13С представлен график % специфического лизиса, опосредованного CTL, при воздействии (i) rhIL-21 (сплошная линия с закрашенными кругами), (ii) контрольного антитела hIgG4 (штриховая пунктирная линия с незакрашенными кругами), (iii) антитела mAb к PD-1 (штриховая пунктирная линия с закрашенными треугольниками), (iv) комбинации rhIL-21 и антитела mAb к PD-1 (точечная пунктирная линия с незакрашенными треугольниками) или (v) слитого белка, содержащего IL-21 R9E/R76A (прерывистая линия с X).

На фигуре 14 представлены концентрации в сыворотке крови (i) антитела mAb к PD-1 (сплошная линия с закрашенными квадратами), (ii) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и гомодимер IL-21 R5Q/R76E (сплошная линия с закрашенными кругами), (iii) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и гомодимер IL-21 R76E (сплошная линия), (iv) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и гомодимер IL-21 R5E/R76A (штриховая пунктирная линия с X), (v) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и гомодимер IL-21 R76A (штриховая пунктирная линия с закрашенными ромбами) или (vi) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и мономер IL-21 R76E (сплошная линия с закрашенными треугольниками).

На фигуре 15А представлена временная шкала отбора образцов клеток (незакрашенные стрелки) и введений (закрашенные стрелки).

На фигуре 15В представлен график кратности изменения количества клеток PD-1<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> (относительно дня -5), измеренного в день 7 у животных, которым вводили дозу (i) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и мутеин IL-21 R76E (столбец с

горизонтальными линиями), (ii) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и мономер одинарного мутеина IL-21 R76E (столбец с вертикальными линиями), или (iii) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и гомодимер двойного мутеина IL-21 R5Q/R76E (незакрашенный столбец) (каждую дозу вводили в день 0).

На фигуре 15C представлен график кратности изменения количества клеток PD-1<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (относительно дня -5), измеренного в день 7 у животных, которым вводили дозу (i) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и мутеин IL-21 R76E (столбец с горизонтальными линиями), (ii) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и мономер одинарного мутеина IL-21 R76E (столбец с вертикальными линиями), или (iii) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и гомодимер двойного мутеина IL-21 R5Q/R76E (незакрашенный столбец) (каждую дозу вводили в день 0).

На фигуре 15D представлен график кратности изменения количества клеток PD-1<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (относительно дня -5), измеренного в день 21 у животных, которым вводили первую дозу (i) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и мутеин IL-21 R76E (столбец с горизонтальными линиями), (ii) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и мономер одинарного мутеина IL-21 R76E (столбец с вертикальными линиями), или (iii) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и гомодимер двойного мутеина IL-21 R5Q/R76E (незакрашенный столбец) (первую дозу вводили в день 0, а вторую дозу вводили в день 8).

На фигуре 16 представлен график зависимости размножения клеток PD-1<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (относительно дня -5) от занятости рецепторов PD-1 (RO) на поверхности клеток PD-1<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Одинарные мутантные варианты IL-21 (801, 802, 807 и 808) показаны внутри синего круга, а двойные мутантные варианты IL-21 (803, 804, 805 и 806) показаны в розовом круге. Эти данные демонстрируют, что превосходящие фармакокинетические свойства двойных мутантных вариантов обеспечивают возможность лучшего охвата мишеней и коррелируют с лучшими фармакодинамическими ответами, измеренными по размножению популяции-мишени PD-1<sup>+</sup>. Синяя линия указывает на общее разграничение между одинарными и двойными мутантными вариантами.

На фигуре 17 представлены диаграммы проточной цитометрии для отдельных животных, обработанных конструкциями с одинарным мутантным гомодимером (животные 801 и 802), конструкциями с двойным мутантным гомодимером (животные 803-806) либо конструкциями с одинарным мутантным мономером (животные 807 и 808). Т-клетки PD-1<sup>+</sup> выявляли с помощью неконкурентных или конкурентных детектирующих антител. Процентный охват мишеней рассчитывается в виде процентного соотношения между конкурентными и неконкурентными антителами к PD-1. Данные показывают, что все конструкции демонстрируют стойкий охват мишеней после повторного введения доз в день 21.

На фигуре 18A представлен график кратности изменения (относительно rhIL-21 (сплошная линия с X в кругах)) активности STAT3 в Т-клетках Hut78 PD-1<sup>-ve</sup>, подвергнутых воздействию слитого белка, содержащего одно из десяти различных антител mAb к PD-1 и

гомодимерный мутеин IL-21 R5Q/R76E. Десять антител mAb к PD-1 включают 20A2.003 (линия с ромбами), 20C1.006 (красные квадраты), 20C1.009 (линия с треугольниками) и 22D4.006 (линия с незакрашенными кругами).

На фигуре 18B представлен график кратности изменения (относительно rhIL-21 (сплошная линия с X в кругах)) активности STAT3 в Т-клетках Hut78 PD-1<sup>+</sup>ve, подвергнутых воздействию слитого белка, содержащего одно из десяти различных антител mAb к PD-1 и гомодимерный мутеин IL-21 R5Q/R76E. Десять антител mAb к PD-1 включают 20A2.003 (линия с ромбами), 20C1.006 (красные квадраты), 20C1.009 (линия с треугольниками) и 22D4.006 (линия с незакрашенными кругами). Сравнение фигуры 18A и фигуры 18B указывает на то, что нацеливание на PD-1 необходимо для передачи сигнала с помощью pSTAT3, и что активность мутеинов является сходной при слиянии с различными антителами mAb к PD-1.

На фигуре 19A представлен график кратности изменения (относительно rhIL-21 (сплошная линия с X в кругах)) активности STAT3 в Т-клетках Hut78 PD-1<sup>-</sup>ve, подвергнутых воздействию слитого белка, содержащего одно из семи различных антител mAb к PD-1 и гомодимерный мутеин IL-21 R9E/R76A. Семь антител mAb к PD-1 включают 20A2.003 (линия с незакрашенными треугольниками), 20C1.006 (линия с незакрашенными квадратами), 20C1.009 (линия с незакрашенными ромбами) и 22D4.006 (линия с незакрашенными кругами).

На фигуре 19B представлен график кратности изменения (относительно rhIL-21 (сплошная линия с X в кругах)) активности STAT3 в Т-клетках Hut78 PD-1<sup>+</sup>ve, подвергнутых воздействию слитого белка, содержащего одно из семи различных антител mAb к PD-1 и гомодимерный мутеин IL-21 R9E/R76A. Сравнение фигуры 19A и фигуры 19B указывает на то, что нацеливание на PD-1 необходимо для передачи сигнала с помощью pSTAT3, и что активность мутеинов является сходной при слиянии с различными антителами mAb к PD-1. Семь антител mAb к PD-1 включают 20A2.003 (линия с незакрашенными треугольниками), 20C1.006 (линия с незакрашенными квадратами), 20C1.009 (линия с незакрашенными ромбами) и 22D4.006 (линия с незакрашенными кругами).

На фигурах 20A-20D представлена величина передачи сигнала с помощью pSTAT3, наблюдаемая при использовании различных продуктов слияния мономерных или димерных двойных мутеинов IL-21 с антителами mAb к PD-1. Сплошная линия с закрашенными кругами (в верхней части графиков) означает rhIL-21; штриховая пунктирная линия с незакрашенными кругами (в нижней части графиков) означает контрольный IgG1; линия с X (в нижней части графиков) означает контрольный IgG2; точечная пунктирная линия с закрашенными квадратами (в нижней части графиков) означает антитело mAb 22D4.006 к PD-1 (присутствует в виде mAb; т. е. не в виде продукта слияния), применяемое в продуктах слияния на основе мутеинов IL-21; штриховая пунктирная линия с незакрашенными квадратами и точечная пунктирная линия с незакрашенными ромбами (в нижней части графиков) означают контрольные антитела mAb к PD-1; остальные линии означают продукты слияния мономерных или димерных двойных мутеинов IL-21 с антителами mAb

к PD-1 (22D4.006) (с различными мутациями с заменой пар заряженных аминокислот), где двойные мутантные варианты представляют собой R5E/R76A; R9E/R76A; R5A/R76E или R5Q/R76E. rhIL-21 демонстрирует активность как в клетках PD-1<sup>-ve</sup>, так и в клетках PD-1<sup>+ve</sup>, продукты слияния на основе мономерных и гомодимерных двойных мутеинов неспособны демонстрировать активность pSTAT3 (на основе IL-21) в клетках PD-1<sup>-ve</sup>, и продукты слияния на основе мономерных и гомодимерных двойных мутеинов способны демонстрировать активность pSTAT3 (обусловленную IL-21) в клетках PD-1<sup>+ve</sup>. Таким образом, мономерные продукты слияния на основе двойных мутантных вариантов IL-21 демонстрируют уровни ослабления активности IL-21 в клетках PD-1<sup>-ve</sup> и сохранения активности IL-21 в клетках PD-1<sup>+ve</sup>, сходные с соответствующими им димерными продуктами слияния. На фигурах 20A и 20B изображены прогоны анализа pSTAT3 в клетках PD-1<sup>-ve</sup> в двух повторностях. На фигурах 20C и 20D изображены прогоны анализа pSTAT3 в клетках PD-1<sup>+ve</sup> в двух повторностях.

На фигурах 21A-21D представлены результаты анализа репортерного гена PD-1 (RGA; фигуры 21A и 21B) и анализа MLR (фигуры 21C и 21D) с теми же продуктами слияния мономерных или димерных двойных мутеинов IL-21 с антителами mAb к PD-1 (22D4.006), которые оцениваются на фигурах 20A-20D. На фигурах 21A-21D продемонстрировано, что продукты слияния мономерных и димерных двойных мутеинов IL-21 с антителами mAb к PD-1 (22D4.006) способны индуцировать активность PD-1. Сплошная линия с закрашенными кругами (в нижней части графиков) означает rhIL-21; линия с незакрашенными кругами (в нижней части графиков) означает контрольный IgG1; линия с X (в нижней части графиков) означает контрольный IgG2; штриховая пунктирная линия с закрашенными квадратами (в верхней части графиков) означает антитело mAb 22D4.006 к PD-1 (присутствует в виде mAb; т. е. не в виде продукта слияния), применяемое в продуктах слияния на основе мутеинов IL-21; штриховая пунктирная линия с незакрашенными квадратами и точечная пунктирная линия с незакрашенными ромбами (в верхней части графиков) означают контрольные антитела mAb к PD-1; остальные линии означают продукты слияния мономерных или димерных двойных мутеинов IL-21 с антителами mAb к PD-1. На фигурах 21A и 21B изображены прогоны анализа RGA PD-1 в двух повторностях. На фигурах 21C и 21D изображены прогоны анализа MLR в двух повторностях.

На фигурах 22A-22D представлены результаты анализов pSTAT3, в которых тестируют те же конструкции, которые изображены на фигурах 20A-20D, если не считать того, что в продуктах слияния мономерных и димерных двойных мутеинов IL-21 с антителами mAb к PD-1 применяют другое антитело mAb к PD-1 (20A2.003). Результаты на фигурах 22A-22D аналогичны результатам, наблюдаемым на фигурах 20A-20D. Сплошная линия с закрашенными кругами (в верхней части графиков) означает rhIL-21; штриховая пунктирная линия с незакрашенными кругами (в нижней части графиков) означает контрольный IgG1; линия с X (в нижней части графиков) означает контрольный IgG2; точечная пунктирная линия с закрашенными квадратами (в нижней части графиков)



означает антитело mAb 20A2.003 к PD-1 (присутствует в виде mAb; т. е. не в виде продукта слияния), применяемое в продуктах слияния на основе мутеинов IL-21; штриховая пунктирная линия с незакрашенными квадратами и точечная пунктирная линия с незакрашенными ромбами (в нижней части графиков) означают контрольные антитела mAb к PD-1; остальные линии означают продукты слияния мономерных или димерных двойных мутеинов IL-21 с антителами mAb (20A2.003) к PD-1 (с различными мутациями с заменой пар заряженных аминокислот), где двойные мутантные варианты представляют собой R5E/R76A; R9E/R76A; R5A/R76E или R5Q/R76E. На фигурах 22A и 22B изображены прогоны анализа pSTAT3 в клетках PD-1<sup>-ve</sup> в двух повторностях. На фигурах 22C и 22D изображены прогоны анализа pSTAT3 в клетках PD-1<sup>+ve</sup> в двух повторностях.

На фигурах 23A-23D представлены результаты анализов репортерного гена PD-1 (фигуры 23A и 23B) и анализов MLR (фигуры 23C и 23D), в которых тестируют те же конструкции, которые изображены на фигурах 21A-21D, если не считать того, что в продуктах слияния мономерных и димерных двойных мутеинов IL-21 с антителами mAb к PD-1 применяют другое антитело mAb к PD-1 (20A2.003). Результаты на фигурах 23A-23D аналогичны результатам, наблюдаемым на фигурах 21A-21D. Сплошная линия с закрашенными кругами (в нижней части графиков) означает rhIL-21; штриховая пунктирная линия с незакрашенными кругами (в нижней части графиков) означает контрольный IgG1; линия с X (в нижней части графиков) означает контрольный IgG2; точечная пунктирная линия (в верхней части графиков) означает антитело mAb 20A2.003 к PD-1 (присутствует в виде mAb; т. е. не в виде продукта слияния), применяемое в продуктах слияния на основе мутеинов IL-21; штриховая пунктирная линия с незакрашенными квадратами и точечная пунктирная линия с незакрашенными ромбами (в верхней части графиков) означают контрольные антитела mAb к PD-1; остальные линии означают продукты слияния мономерных или димерных двойных мутеинов IL-21 с антителами mAb к PD-1 (20A2.003). На фигурах 23A и 23B изображены прогоны анализа RGA PD-1 в двух повторностях. На фигурах 23C и 23D изображены прогоны анализа MLR в двух повторностях.

На фигуре 24 представлен график зависимости активности NFAT/люциферазы под действием очищенных антител к PD-1 от концентрации mAb.

На фигуре 25A представлен график кратности изменения количества клеток Ki67+/CD3+/CD4+ относительно исходного уровня при воздействии слитого белка [22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер) или антитела к PD-1 [22D4.017].

На фигуре 25B представлен график кратности изменения количества клеток Ki67+/CD3+/CD8+ относительно исходного уровня при воздействии слитого белка [22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер) или антитела к PD-1 [22D4.017].

На фигуре 25C представлен график кратности изменения количества клеток pSTAT3+/CD3+/CD4+ относительно исходного уровня при воздействии слитого белка [22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер) или антитела к PD-1 [22D4.017].

На фигуре 25D представлен график кратности изменения количества клеток

pSTAT3+/CD3+/CD8+ относительно исходного уровня при воздействии слитого белка [22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер) или антитела к PD-1 [22D4.017].

На фигуре 25E представлен график кратности изменения количества клеток CD3+/CD4+ относительно исходного уровня при воздействии слитого белка [22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер) или антитела к PD-1 [22D4.017].

На фигуре 25F представлен график кратности изменения количества клеток CD3+/CD8+ относительно исходного уровня при воздействии слитого белка [22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер) или антитела к PD-1 [22D4.017].

На фигуре 25G представлен график кратности изменения количества клеток PD-1+/CD3+/CD4+ относительно исходного уровня при воздействии слитого белка [22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер) или антитела к PD-1 [22D4.017].

На фигуре 25H представлен график кратности изменения количества клеток PD-1+/CD3+/CD84+ относительно исходного уровня при воздействии слитого белка [22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер) или антитела к PD-1 [22D4.017].

На фигуре 25I представлен график кратности изменения количества перфорины сыворотки крови относительно исходного уровня после 72 часов воздействия слитого белка [22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер) или антитела к PD-1 [22D4.017].

На фигуре 25J представлен график зависимости % клеток Ki67+ относительно исходного уровня от кратности увеличения количества перфорины после 72 часов воздействия слитого белка [22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер) или антитела к PD-1 [22D4.017].

На фигуре 26A представлен график зависимости оптического поглощения (нм) от времени (с), применяемый для определения указанной  $K_D$  антитела 22D4.017 в отношении антигена PD-1 человека.

На фигуре 26B представлен график зависимости оптического поглощения (нм) от времени (с), применяемый для определения указанной  $K_D$  антитела 20C1.009 в отношении антигена PD-1 человека.

На фигуре 26C представлен график зависимости оптического поглощения (нм) от времени (с), применяемый для определения указанной  $K_D$  антитела 20A2.003 в отношении антигена PD-1 человека.

На фигуре 26D представлен график зависимости оптического поглощения (нм) от времени (с), применяемый для определения указанной  $K_D$  антитела mAb IgG1 к PD-1 в отношении антигена PD-1 человека.

На фигуре 26E представлен график зависимости оптического поглощения (нм) от времени (с), применяемый для определения указанной  $K_D$  антитела mAb IgG4 к PD-1 в отношении антигена PD-1 человека.

На фигуре 26F представлен график зависимости оптического поглощения (нм) от времени (с), применяемый для определения указанной  $K_D$  22D4.017 в отношении антигена PD-1 яванского макака.

На фигуре 26G представлен график зависимости оптического поглощения (нм) от

времени (с), применяемый для определения указанной  $K_D$  антитела 20C1.009 в отношении антигена PD-1 яванского макака.

На фигуре 26H представлен график зависимости оптического поглощения (нм) от времени (с), применяемый для определения указанной  $K_D$  антитела 20A2.003 в отношении антигена PD-1 яванского макака.

На фигуре 26I представлен график зависимости оптического поглощения (нм) от времени (с), применяемый для определения указанной  $K_D$  антитела mAb IgG1 к PD-1 в отношении антигена PD-1 яванского макака.

На фигуре 26J представлен график зависимости оптического поглощения (нм) от времени (с), применяемый для определения указанной  $K_D$  антитела mAb IgG4 к PD-1 в отношении антигена PD-1 яванского макака.

На фигуре 27 представлен график зависимости  $C_p$  (ккал/моль/°C) от температуры для антител 22D4.017 и 20C1.009 к PD-1.

На фигуре 28 представлен график вязкости, отложенной в зависимости от скорости сдвига, для антител 22D4.017 и 20C1.009 к PD-1.

На фигурах 29A-29D представлена серия графиков, на которых сигнал отложен в зависимости от концентрации антитела в (фиг. 29A) вариантной линии Т-клеток Hut78, которая является положительной по PD-1, (фиг. 29B) вариантной линии Т-клеток Hut78, которая является положительной по TIGIT, (фиг. 29C) вариантной линии Т-клеток Hut78, которая является положительной по LAG3, и (фиг. 29D) родительской линии Т-клеток Hut78, которая не экспрессирует эндогенно PD-1, TIGIT или LAG3.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

Остается потребность в новых подходах к стимуляции иммунитета, которые могут направлять иммунную систему против раковых клеток безопасным и эффективным способом, особенно в свете того, что современные иммунотерапевтические подходы эффективны только для меньшинства пациентов и могут характеризоваться значительной и часто непредсказуемой токсичностью. В одном аспекте новый класс бифункциональных слитых молекул, содержащих антитело, нацеливающееся на PD-1, которое может блокировать взаимодействие PD-1/PD-L1, слитое со сконструированным мутеином интерлейкина-21 с ослабленной аффинностью, раскрытым в данном документе, удовлетворяет данную потребность. Продукты слияния антител и цитокинов, описанные в данном документе, преодолевают значительные барьеры, связанные с терапевтическими средствами на основе цитокинов, что позволяет осуществлять, помимо прочего, введение доз подобно антителам и селективную доставку цитокина IL-21 с нацеливанием на PD-1. При слиянии с антителом к PD-1 мутеины IL-21 могут селективно активировать Т-клетки, экспрессирующие PD-1, и обеспечивать их размножение *in vivo*. Соответственно, продукты слияния антител и цитокинов, описанные в данном документе, могут улучшать и расширять применимость терапевтических средств на основе антител к PD-1, тестируемых в настоящее время в клинических условиях.

Комбинация цитокина и совместно ингибирующих агонистов или антагонистов

рецепторов остается проблемной из-за рисков возрастающей токсичности и необходимости разработки сложного клинического испытания (см., например, Ott et al., *J Immunother Cancer* **5**, 16 (2017); и Hermel et al., *Cancer Metastasis Rev* **36**, 43-50 (2017)). Что касается цитокинов, существует также возможность активации путей ингибирования по принципу обратной связи, которые могут приводить к подавлению иммунных ответов (см., например, Portielje et al., *Clin Cancer Res* **9**, 76-83 (2003); Wan et al., *Immunity* **38**, 514-527 (2013); и Mooradian et al., *Oncoimmunology* **7**, e1423172 (2018)). Интерлейкин-21 (IL-21) является цитокином I типа и представителем семейства цитокинов с общей гамма-цепью (сγ-цепью) рецепторов цитокинов, который появился в качестве перспективного иммунотерапевтического средства для лечения рака. IL-21 продуцируется активированными CD4 Т-клетками и Т-клетками, являющимися естественными киллерами (NKT), и передает сигналы с помощью гетеродимерного рецепторного комплекса, состоящего из отдельной субъединицы рецептора IL-21 (IL-21R), связанной с общей гамма-цепью (см., например, Spolski et al., *Nat Rev Drug Discov* **13**, 379-395 (2014)). Активация комплекса IL-21R приводит к активации сигнального пути JAK/STAT. IL-21R широко экспрессируется в гемопоэтических клетках, в том числе Т- и В-лимфоцитах, естественных клетках-киллерах (NK) и миелоидных клетках. Хотя он не является существенным фактором роста или дифференцировки, IL-21 является сильным митогеном и фактором выживания для NK-клеток и активированных Т-клеток. IL-21 может обеспечивать дифференцировку CD4 (+) Т-хелперов 17 (Th17), а также клеток, являющихся фолликулярными Т-хелперами (Tfh), и может проявлять антагонистическое действие в отношении дифференцировки регуляторных Т-клеток (Treg). Более того, IL-21 может повышать выживаемость CD8 Т-клеток и сохраняет менее активированный, но более устойчивый фенотип Т-клеток, который позволяет усиливать контроль опухолей и вирусов.

Проблемным аспектом иммунотерапии цитокинами является то, что в дополнение к активации клеток иммунной системы для стимуляции иммунных ответов, тот же цитокин может также активировать контррегуляторные пути. Например, IL-2 и IFN $\gamma$  могут соответственно активировать защитные иммунные ответы, а также ответы, опосредованные регуляторными Т-клетками, и ингибирующие пути (такие как PD-L1). В дендритных клетках (DC) IL-21 может ингибировать как созревание, так и активацию DC, может индуцировать апоптоз обычных DC, может сильно ингибировать примирование Т-клеток в смешанных культурах и может играть роль в индукции толерантности. У людей IL-21 был протестирован в качестве ненацеливающегося свободного цитокина при нескольких раковых показаниях, но, несмотря на перспективные доклинические данные и ранние клинические данные фазы I, разработка данного подхода не продвинулась дальше тестирования в фазе II (см., например, Thompson et al., *J Clin Oncol* **26**, 2034-2039 (2008); и Davis et al., *Clin Cancer Res* **15**, 2123-2129 (2009)). В более поздних доклинических моделях с применением комбинации рекомбинантного цитокина IL-21 с совместно ингибирующими антагонистами рецепторов (например, антителами к CTLA-4 и антителами к PD-1) было продемонстрировано, что IL-21 может увеличивать эффективность этих средств лечения.

Такие комбинации в настоящее время тестируются в клинических условиях, хотя клиническая эффективность еще не была продемонстрирована (Lewis et al., *Oncoimmunology* 7, e1377873 (2017)).

Без ограничения какой-либо теорией, продукты слияния антител и цитокинов, описанные в данном документе, разрабатывают для использования иммуностимулирующей активности IL-21 (которая может быть необходимым условием для решения проблем с токсичностью и подавления нецелевых иммунных ответов), для максимального увеличения эффективности и улучшения осуществимости введения доз в клинических условиях.

#### *IL-21 и мутеины IL-21*

Интерлейкин-21 (IL-21) представляет собой цитокин, экспрессирующийся в Т-клетках, В-клетках, НК-клетках и миелоидных клетках и регулирующий активность клеток как врожденной, так и адаптивной иммунной системы, а также улучшающий выживаемость и эффекторную функцию Т-клеток. IL-21 включен в несколько клинических испытаний фазы I и II в качестве исследуемого препарата для лечения видов рака, воспалительных заболеваний и аутоиммунных заболеваний, в том числе меланомы, почечноклеточной карциномы, острого миелоидного лейкоза, неходжкинской лимфомы, рака яичника, колоректального рака, системной красной волчанки, болезни Крона и ревматоидного артрита.

IL-21 имеет структуру четырехспирального пучка и существует в виде мономера. У людей известны две изоформы IL-21, каждая из которых происходит из молекулы-предшественника. Первая изоформа IL-21 содержит 162 аминокислоты (аа), первые 29 из которых составляют сигнальный пептид; а вторая изоформа IL-21 содержит 153 аа, первые 29 из которых составляют сигнальный пептид, как и в первой изоформе. Аминокислотные последовательности первой и второй изоформ IL-21 (в том числе сигнального пептида) предусмотрены в данном документе под SEQ ID NO: 258 и под SEQ ID NO: 259 соответственно.

IL-21 связывается с гетеродимерным рецептором IL-21 (IL-21R), экспрессирующимся на поверхности Т-, В- и НК-клеток. IL-21R сходен по структуре с рецептором IL-2 и рецептором IL-15 тем, что каждый из этих рецепторов цитокинов содержит общую гамма-цепь ( $\gamma$ c). В дополнение к  $\gamma$ c, IL-21R содержит альфа-цепь, которая важна для связывания с IL-21. Существует две изоформы альфа-цепи рецептора IL-21 человека: изоформа 1 и изоформа 2. Аминокислотные последовательности изоформы 1 и изоформы 2 предусмотрены в данном документе под SEQ ID NO: 256 и 261 соответственно. Аминокислотная последовательность общей гамма-цепи человека предусмотрена в данном документе под SEQ ID NO: 257.

Когда IL-21 связывается с IL-21R, то активируется сигнальный путь Jak/STAT с активацией генов-мишеней. Хотя индуцированная IL-21 передача сигнала может быть терапевтически желаемой, необходимо тщательное изучение временных рамок и местоположения передачи сигнала с учетом широкого профиля экспрессии IL-21 и ввиду того, что IL-21 обладает способностью к стимуляции ответов, опосредованных CD8 Т-

клетками, а также к подавлению презентации антигенов и примирования Т-клеток. Данные, представленные в данном документе, впервые подтверждают применение тщательно разработанных мутеинов IL-21 для достижения передачи сигнала с помощью IL-21 в подходящее время и в подходящем месте.

В настоящем изобретении предусмотрены мутеины IL-21, содержащие по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 дикого типа, которая предусмотрена в данном документе под SEQ ID NO: 1. Например, мутеин IL-21 содержит по меньшей мере одну и не более 34 аминокислотных замен. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит по меньшей мере одну и не более X аминокислотных замен, где X равняется 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, или 34.. В иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности IL-21 человека (SEQ ID NO: 1) не более чем 10 аминокислотами, 15 аминокислотами, 20 аминокислотами или 25 аминокислотами. В иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности IL-21 человека (SEQ ID NO: 1) не более чем 7 аминокислотами или не более чем 5 аминокислотами. В иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности IL-21 человека (SEQ ID NO: 1) 3, 4, 5 или 6 аминокислотами. В иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности IL-21 человека (SEQ ID NO: 1) 3-6 аминокислотами или 1-5 аминокислотами. В иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности IL-21 человека (SEQ ID NO: 1) одной или двумя аминокислотами.

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, где SEQ ID NO: 2 представляет собой

QGQDX HMXXM XXXXX XVDXL KNXVN DLVPE FLPAP EDVET NCEWS  
AFSCF QKAQL KSANT GNNEX XIXXX XXXLX XXXXX TNAGR RQKHR LTCPS CDSYE  
KKPPK EFLXX FXXLL XXMXX QHXSS RTHGS EDS (SEQ ID NO: 2), где X представляет собой любую аминокислоту, и где аминокислотная последовательность мутеина IL-21 отличается от аминокислотной последовательности IL-21 человека (SEQ ID NO: 1) по меньшей мере 1 аминокислотой.

Таким образом, в иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит последовательность под SEQ ID NO: 2, где SEQ ID NO: 2 отличается от SEQ ID NO: 1 по меньшей мере одной аминокислотой в положении, обозначенном X в SEQ ID NO: 2. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21, содержащий SEQ ID NO: 2, характеризуется по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере

приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризующуюся более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1.

В иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 дикого типа, и при этом аминокислотная(аминокислотные) замена(замены) имеет(имеют) место в пределах N-концевой половины аминокислотной последовательности. Например, аминокислотная(аминокислотные) замена(замены) имеет(имеют) место в положении в пределах положений 5-25 или 8-23 (в обоих случаях включительно) в соответствии с нумерацией аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1.

В иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 дикого типа, и при этом аминокислотная(аминокислотные) замена(замены) имеет(имеют) место в пределах C-концевой половины аминокислотной последовательности. Например, аминокислотная(аминокислотные) замена(замены) имеет(имеют) место в положении в пределах положений 100-133 или 109-123 (в обоих случаях включительно) в соответствии с нумерацией аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1.

В иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 дикого типа, и при этом аминокислотная(аминокислотные) замена(замены) имеет(имеют) место в средней трети аминокислотной последовательности. Например, аминокислотная(аминокислотные) замена(замены) имеет(имеют) место в положении в пределах положений 55-85 или 65-80 (в обоих случаях включительно) в соответствии с нумерацией аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1.

В настоящем изобретении также предусмотрены мутеины IL-21, содержащие только

одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 дикого типа, которая предусмотрена в данном документе под SEQ ID NO: 1. В иллюстративных аспектах аминокислотная замена находится в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 109, 110, 112, 113, 116, 117, 119, 120, или 123 в соответствии с нумерацией аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1. В других иллюстративных аспектах аминокислотная замена находится в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 65, 66, 68, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 109, 110, 112, 113, 116, 117, 119, 120, или 123 в соответствии с нумерацией аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1. В еще нескольких других иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит любую из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 3-21 и 23-37.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены мутеины IL-21, содержащие только две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 1. В иллюстративных аспектах аминокислотные замены находятся в двух аминокислотных положениях, выбранных из группы, состоящей из 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 109, 110, 112, 113, 116, 117, 119, 120, или 123 в соответствии с нумерацией аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1. В других иллюстративных аспектах аминокислотные замены находятся в двух аминокислотных положениях, выбранных из группы, состоящей из 5, 9, 15, 70, 71, 72, 73, и 76 в соответствии с нумерацией аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1. В еще нескольких других иллюстративных аспектах аминокислотные замены находятся в двух аминокислотных положениях, выбранных из группы, состоящей из 5, 9, 73 и 76 в соответствии с нумерацией аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1. В иллюстративных аспектах по меньшей мере одна из двух аминокислотных замен находится в положении 76 в соответствии с нумерацией аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит любую из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 199-208 и 210-212.

В иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 дикого типа, и аминокислотная(аминокислотные) замена(замены) является/являются консервативной(консервативными) аминокислотной(аминокислотными) заменой(заменами). Используемый в данном документе термин "консервативная аминокислотная замена" означает замену одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей аналогичные свойства, например, размер, заряд, гидрофобность, гидрофильность и/или ароматичность, и включает замены в пределах одной из следующих пяти групп:

I. Небольшие алифатические неполярные или слабополярные остатки: Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Полярные отрицательно заряженные остатки и их амиды и сложные эфиры: Asp,



Asn, Glu, Gln, цистеиновая кислота и гомоцистеиновая кислота;

III. Полярные, положительно заряженные остатки: His, Arg, Lys; орнитин (Orn)

IV. Крупные алифатические неполярные остатки: Met, Leu, Ile, Val, Cys, норлейцин (Nle), гомоцистеин

V. Крупные ароматические остатки: Phe, Tyr, Trp, ацетилфенилаланин.

В иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 дикого типа, и аминокислотная(аминокислотные) замена(замены) является/являются неконсервативной(неконсервативными) аминокислотной(аминокислотными) заменой(заменами). Используемый в данном документе термин "неконсервативная аминокислотная замена" определяется в данном документе как замена одной аминокислоты другой аминокислотой, имеющей другие свойства, например, размер, заряд, гидрофобность, гидрофильность и/или ароматичность, и включает замены за пределами вышеуказанных пяти групп.

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 дикого типа, и при этом заменяющая аминокислота является аминокислотой, встречающейся в природе. Под "встречающейся в природе аминокислотой", или "стандартной аминокислотой", или "канонической аминокислотой" подразумевают одну из 20 альфа-аминокислот, обнаруживаемых у эукариот и кодируемых непосредственно кодонами универсального генетического кода (Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp, Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro, Arg, His, Lys, Asp, Glu). В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 дикого типа, и заменяющая аминокислота является нестандартной аминокислотой или аминокислотой, которая не включается в состав белков в ходе трансляции. Нестандартные аминокислоты включают без ограничения: селеноцистеин, пирролизин, орнитин, норлейцин,  $\beta$ -аминокислоты (например,  $\beta$ -аланин,  $\beta$ -аминоизомасляную кислоту,  $\beta$ -фенилаланин,  $\beta$ -гомофенилаланин,  $\beta$ -глутаминовую кислоту,  $\beta$ -глутамин,  $\beta$ -гомотриптофан,  $\beta$ -лейцин,  $\beta$ -лизин), гомоаминокислоты (например, гомофенилаланин, гомосерин, гомоаргинин, моноцистеин, гомоцистин), *N*-метиламинокислоты (например, L-абрин, *N*-метилаланин, *N*-метилизомлейцин, *N*-метиллейцин), 2-аминокаприловую кислоту, 7-аминоцефалоспоровую кислоту, 4-аминокоричную кислоту, альфа-аминоциклогексанпропионовую кислоту, амино(4-гидроксифенил)уксусную кислоту, 4-аминоникотиновую кислоту, 3-аминофенилуксусную кислоту и т. п.

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной аминокислотной заменой по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 человека (SEQ ID NO: 1), при

этом аминокислотная замена имеет место в одном или нескольких из положений 5, 8, 9, 12, 14, 15, 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 80, 116, и 119 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая(заменяющие) аминокислота(аминокислоты) является/являются алифатическими аминокислотами. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с только одной аминокислотной заменой по сравнению с SEQ ID NO: 1, при этом аминокислотная замена имеет место в положении 5, 8, 9, 12, 14, 15, 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 80, 116, или 119 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая аминокислота является алифатической аминокислотой.

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной аминокислотной заменой по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 человека (SEQ ID NO: 1), при этом аминокислотная замена имеет место в одном или нескольких из положений 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 110, 112, 116, 117, 119, 120, или 123 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая(заменяющие) аминокислота(аминокислоты) является/являются кислыми аминокислотами. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с только одной аминокислотной заменой по сравнению с SEQ ID NO: 1, при этом аминокислотная замена имеет место в положении 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 110, 112, 116, 117, 119, 120, или 123 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая аминокислота является кислой аминокислотой.

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной аминокислотной заменой по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 человека (SEQ ID NO: 1), при этом аминокислотная замена имеет место в одном или нескольких из положений 5, 9, 73, 76, 109, 113, или 116 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая(заменяющие) аминокислота(аминокислоты) является/являются основными аминокислотами. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с только одной аминокислотной заменой по сравнению с SEQ ID NO: 1, и аминокислота в положении 5, 9, 73, 76, 109, 113 или 116 в SEQ ID NO: 1 является основной аминокислотой.

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной аминокислотной заменой по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 человека (SEQ ID NO: 1), при этом аминокислотная замена имеет место в одном или нескольких из положений 5, 8, 9, 70 или 76 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая(заменяющие) аминокислота(аминокислоты) является/являются ароматическими аминокислотами. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с только одной аминокислотной заменой по сравнению с SEQ ID NO: 1, при этом аминокислотная замена имеет место в положении 5, 8, 9, 70 или 76 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая аминокислота является ароматической аминокислотой.

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной аминокислотной заменой по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 человека (SEQ ID NO: 1), при этом аминокислотная замена имеет место в одном или нескольких из положений 5, 8, 9, 12, 15, 73, 76, 116, или 119 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая(заменяющие) аминокислота(аминокислоты) является/являются аминокислотами, содержащими амидную группу в боковой цепи. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с только одной аминокислотной заменой по сравнению с SEQ ID NO: 1, при этом аминокислотная замена имеет место в положении 5, 8, 9, 12, 15, 73, 76, 116, или 119 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая аминокислота является аминокислотой, содержащей амидную группу в боковой цепи.

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной аминокислотной заменой по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 человека (SEQ ID NO: 1), при этом аминокислотная замена имеет место в одном или нескольких из положений 5, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 73, 76, 116, или 119 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая(заменяющие) аминокислота(аминокислоты) является/являются аминокислотами, содержащими гидроксильную группу в боковой цепи. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с только одной аминокислотной заменой по сравнению с SEQ ID NO: 1, при этом аминокислотная замена имеет место в положении 5, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 73, 76, 116, или 119 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая аминокислота является аминокислотой, содержащей гидроксильную группу в боковой цепи.

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной аминокислотной заменой по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 человека (SEQ ID NO: 1), при этом аминокислотная замена имеет место в одном или нескольких из положений 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, или 80 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая(заменяющие) аминокислота(аминокислоты) является/являются иминокислотами. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с только одной аминокислотной заменой по сравнению с SEQ ID NO: 1, при этом аминокислотная замена имеет место в положении 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, или 80 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая аминокислота является аминокислотой, содержащей иминокислоту.

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной аминокислотной заменой по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 человека (SEQ ID NO: 1), при этом аминокислотная замена имеет место в одном или нескольких из положений 5, 9, 15, 76, 116 или 119 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая(заменяющие) аминокислота(аминокислоты) является/являются аминокислотами, содержащими серосодержащую боковую цепь. В

иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с только одной аминокислотной заменой по сравнению с SEQ ID NO: 1, при этом аминокислотная замена имеет место в положении 5, 9, 15, 76, 116 или 119 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая аминокислота является аминокислотой, содержащей серосодержащую боковую цепь.

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере одной аминокислотной заменой по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 человека (SEQ ID NO: 1), где по меньшей мере одна аминокислотная замена показана в таблице А.

ТАБЛИЦА А

| Аминокислотное положение в SEQ ID NO: 1 | Примеры заменяющих аминокислот (в виде однобуквенного кода) | Иллюстративная SEQ ID NO: |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 5                                       | A, D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, Y                 | 38                        |
| 8                                       | A, D, E, G, N, S                                            | 39                        |
| 9                                       | A, D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, Y                 | 40                        |
| 11                                      | D, S                                                        | 41                        |
| 12                                      | A, D, E, N, S, T, V                                         | 42                        |
| 13                                      | D                                                           | 43                        |
| 14                                      | A, D, S                                                     | 44                        |
| 15                                      | A, E, I, M, N, Q, S, T, V                                   | 45                        |
| 16                                      | D, E                                                        | 46                        |
| 19                                      | D                                                           | 47                        |
| 23                                      | D                                                           | 48                        |
| 65                                      | D, G, P                                                     | 49                        |
| 66                                      | D, G, P                                                     | 50                        |
| 68                                      | Q                                                           | 51                        |
| 69                                      | D, G, P                                                     | 52                        |
| 70                                      | E, G, P, Y, T                                               | 53                        |
| 71                                      | L                                                           | 54                        |
| 72                                      | A, D, G, P                                                  | 55                        |
| 73                                      | A, D, E, G, H, I, N, P, Q, S, V                             | 56                        |
| 75                                      | D, G, P                                                     | 58                        |
| 76                                      | A, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, Y              | 59                        |
| 77                                      | D, G, P                                                     | 60                        |

|     |                                 |    |
|-----|---------------------------------|----|
| 78  | D                               | 61 |
| 79  | D                               | 62 |
| 80  | G, P                            | 63 |
| 109 | K                               | 64 |
| 110 | D                               | 65 |
| 112 | D                               | 66 |
| 113 | K                               | 67 |
| 116 | A, D, E, I, K, L, M, N, S, T, V | 68 |
| 117 | D                               | 69 |
| 119 | A, D, E, M, N, Q, S, T          | 70 |
| 120 | D                               | 71 |
| 123 | D                               | 72 |

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с только одной аминокислотной заменой по сравнению с SEQ ID NO: 1, и аминокислотная замена является одной из замен, показанных в таблице А. В других вариантах осуществления мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность с двумя аминокислотными заменами по сравнению с SEQ ID NO: 1, и аминокислотные замены являются двумя из замен, показанных в таблице А.

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, показанную в таблице В.

ТАБЛИЦА В

| Аминокислотная замена | Аминокислотное положение в SEQ ID NO: 1 | Заменяющая аминокислота | SEQ ID NO: |  | Аминокислотная замена | Аминокислотное положение в SEQ ID NO: 1 | Заменяющая аминокислота | SEQ ID NO: |
|-----------------------|-----------------------------------------|-------------------------|------------|--|-----------------------|-----------------------------------------|-------------------------|------------|
| R5A                   | 5                                       | A                       | 73         |  | S70E                  | 70                                      | E                       | 136        |
| R5D                   | 5                                       | D                       | 74         |  | S70G                  | 70                                      | G                       | 137        |
| R5E                   | 5                                       | E                       | 75         |  | S70P                  | 70                                      | P                       | 138        |
| R5G                   | 5                                       | G                       | 76         |  | S70Y                  | 70                                      | Y                       | 139        |
| R5H                   | 5                                       | H                       | 77         |  | S70T                  | 70                                      | T                       | 140        |
| R5I                   | 5                                       | I                       | 78         |  | K72D                  | 72                                      | D                       | 141        |
| R5K                   | 5                                       | K                       | 79         |  | K72G                  | 72                                      | G                       | 142        |
| R5L                   | 5                                       | L                       | 80         |  | K72P                  | 72                                      | P                       | 143        |

|      |    |   |     |      |    |   |     |
|------|----|---|-----|------|----|---|-----|
| R5M  | 5  | M | 81  | K72A | 72 | A | 144 |
| R5N  | 5  | N | 82  | K73A | 73 | A | 145 |
| R5Q  | 5  | Q | 83  | K73D | 73 | D | 146 |
| R5S  | 5  | S | 84  | K73E | 73 | E | 147 |
| R5T  | 5  | T | 85  | K73G | 73 | G | 148 |
| R5V  | 5  | V | 86  | K73H | 73 | H | 149 |
| R5Y  | 5  | Y | 87  | K73I | 73 | I | 150 |
| I8A  | 8  | A | 88  | K73N | 73 | N | 151 |
| I8D  | 8  | D | 89  | K73P | 73 | P | 152 |
| I8E  | 8  | E | 90  | K73Q | 73 | Q | 153 |
| I8G  | 8  | G | 91  | K73S | 73 | S | 154 |
| I8N  | 8  | N | 92  | K73V | 73 | V | 155 |
| I8S  | 8  | S | 93  | K75D | 75 | D | 156 |
| R9A  | 9  | A | 94  | K75G | 75 | G | 157 |
| R9D  | 9  | D | 95  | K75P | 75 | P | 158 |
| R9E  | 9  | E | 96  | R76A | 76 | A | 159 |
| R9G  | 9  | G | 97  | R76D | 76 | D | 160 |
| R9H  | 9  | H | 98  | R76E | 76 | E | 161 |
| R9I  | 9  | I | 99  | R76G | 76 | G | 162 |
| R9K  | 9  | K | 100 | R76H | 76 | H | 163 |
| R9L  | 9  | L | 101 | R76I | 76 | I | 164 |
| R9M  | 9  | M | 102 | R76K | 76 | K | 165 |
| R9N  | 9  | N | 103 | R76L | 76 | L | 166 |
| R9Q  | 9  | Q | 104 | R76M | 76 | M | 167 |
| R9S  | 9  | S | 105 | R76N | 76 | N | 168 |
| R9T  | 9  | T | 106 | R76P | 76 | P | 169 |
| R9V  | 9  | V | 107 | R76Q | 76 | Q | 170 |
| R9Y  | 9  | Y | 108 | R76S | 76 | S | 171 |
| R11D | 11 | D | 109 | R76T | 76 | T | 172 |
| R11S | 11 | S | 110 | R76V | 76 | V | 173 |
| Q12A | 12 | A | 111 | R76Y | 76 | Y | 174 |
| Q12D | 12 | D | 249 | K77D | 77 | D | 175 |
| Q12E | 12 | E | 250 | K77G | 77 | G | 176 |
| Q12N | 12 | N | 251 | K77P | 77 | P | 177 |

|      |    |   |     |       |     |   |     |
|------|----|---|-----|-------|-----|---|-----|
| Q12S | 12 | S | 252 | P78D  | 78  | D | 61  |
| Q12T | 12 | T | 253 | P79D  | 79  | D | 62  |
| Q12V | 12 | V | 254 | S80G  | 80  | G | 178 |
| L13D | 13 | D | 112 | S80P  | 80  | P | 179 |
| I14A | 14 | A | 114 | E109K | 109 | K | 64  |
| I14D | 14 | D | 115 | R110D | 110 | D | 65  |
| I14S | 14 | S | 116 | K112D | 112 | D | 66  |
| D15A | 15 | A | 117 | S113K | 113 | K | 67  |
| D15E | 15 | E | 118 | Q116A | 116 | A | 180 |
| D15I | 15 | I | 119 | Q116D | 116 | D | 181 |
| D15M | 15 | M | 120 | Q116E | 116 | E | 182 |
| D15N | 15 | N | 121 | Q116I | 116 | I | 183 |
| D15Q | 15 | Q | 122 | Q116K | 116 | K | 184 |
| D15S | 15 | S | 123 | Q116L | 116 | L | 185 |
| D15T | 15 | T | 283 | Q116M | 116 | M | 186 |
| D15V | 15 | V | 124 | Q116N | 116 | N | 187 |
| I16D | 16 | D | 125 | Q116S | 116 | S | 188 |
| I16E | 16 | E | 126 | Q116T | 116 | T | 189 |
| Q19D | 19 | D | 47  | Q116V | 116 | V | 190 |
| Y23D | 23 | D | 48  | K117D | 117 | D | 69  |
| R65D | 65 | D | 127 | I119A | 119 | A | 191 |
| R65G | 65 | G | 128 | I119D | 119 | D | 192 |
| R65P | 65 | P | 129 | I119E | 119 | E | 193 |
| I66D | 66 | D | 130 | I119M | 119 | M | 194 |
| I66G | 66 | G | 131 | I119N | 119 | N | 195 |
| I66P | 66 | P | 132 | I119Q | 119 | Q | 196 |
| N68Q | 68 | Q | 51  | I119S | 119 | S | 197 |
| V69D | 69 | D | 133 | I119T | 119 | T | 198 |
| V69G | 69 | G | 134 | H120D | 120 | D | 71  |
| V69P | 69 | P | 135 | L123D | 123 | D | 72  |

В иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 47, 48, 51, 61, 62, 64-67, 69, 71-112, 114-198, 249-254, или 283. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере

мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризующуюся более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с одной из последовательностей под SEQ ID NO: 47, 48, 51, 61, 62, 64-67, 69, 71-112, 114-198, 249-254, или 283.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены мутеины IL-21, содержащие только две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 1, и при этом две аминокислотные замены имеют место в двух из положений 5, 9, 15, 70, 71, 72, 73, и 76 в SEQ ID NO: 1. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит только две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 1, и при этом две замены имеют место в паре аминокислотных положений, выбранных из группы, состоящей из 5 и 76; 9 и 76; 15 и 70; 15 и 71; 15 и 72; 15 и 73; 70 и 73; 70 и 76; 71 и 73; 71 и 76; 72 и 73; 72 и 76 и 73 и 76. В иллюстративных аспектах IL-21 содержит любую из аминокислотных последовательностей под SEQ ID NO: 199-208 и 210-212. В других аспектах в настоящем изобретении дополнительно предусмотрены мутеины IL-21, содержащие только две аминокислотные замены по сравнению с SEQ ID NO: 1, и при этом две аминокислотные замены имеют место в двух из положений 5, 9, 73 и 76 в SEQ ID NO: 1. В иллюстративных аспектах одна из замен имеет место в положении 76 в SEQ ID NO: 1. В иллюстративных аспектах заменяющая аминокислота в положении 76 в SEQ ID NO: 1 является алифатической аминокислотой или кислой аминокислотой. В иллюстративных аспектах алифатическая аминокислота представляет собой аланин. В иллюстративных аспектах кислая аминокислота представляет собой аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту. В иллюстративных аспектах кислая аминокислота представляет собой глутаминовую кислоту. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит заменяющую аминокислоту в положении 76 и алифатическую аминокислоту или кислую аминокислоту в положении 5, 9 или 73 в SEQ ID NO: 1. В иллюстративных аспектах заменяющая аминокислота в положении 5, 9 или 73 является алифатической аминокислотой, кислой аминокислотой или аминокислотой с амидной группой в боковой цепи. В иллюстративных аспектах алифатическая аминокислота представляет собой аланин, кислая аминокислота представляет собой глутаминовую кислоту, и аминокислота с амидной группой в боковой цепи представляет собой глутамин. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит заменяющую аминокислоту в положении 76 в SEQ ID NO: 1 (необязательно алифатическую аминокислоту или кислую аминокислоту) и заменяющую аминокислоту в положении 5 или 9 (в соответствии с нумерацией в SEQ ID NO: 1).

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO, показанных в таблице С.

#### ТАБЛИЦА С



| Аминокислотные замены | 1-е аминокислотное положение в SEQ ID NO: 1 | 1-я заменяющая аминокислота | 2-е аминокислотное положение в SEQ ID NO: 1 | 2-я заменяющая аминокислота | SEQ ID NO: |
|-----------------------|---------------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------|------------|
| R5E, R76E             | 5                                           | E                           | 76                                          | E                           | 239        |
| R5E, R76A             | 5                                           | E                           | 76                                          | A                           | 238        |
| R5A, R76A             | 5                                           | A                           | 76                                          | A                           | 236        |
| R5Q, R76A             | 5                                           | Q                           | 76                                          | A                           | 240        |
| R5A, R76E             | 5                                           | A                           | 76                                          | E                           | 237        |
| R5Q, R76E             | 5                                           | Q                           | 76                                          | E                           | 241        |
| R9E, R76E             | 9                                           | E                           | 76                                          | E                           | 245        |
| R9A, R76E             | 9                                           | A                           | 76                                          | E                           | 243        |
| R9E, R76A             | 9                                           | E                           | 76                                          | A                           | 244        |
| R9A, R76A             | 9                                           | A                           | 76                                          | A                           | 242        |
| D15N, S70T            | 15                                          | N                           | 70                                          | T                           | 213        |
| D15N, I71L            | 15                                          | N                           | 71                                          | L                           | 214        |
| D15N, K72A            | 15                                          | N                           | 72                                          | A                           | 215        |
| D15N, K73A            | 15                                          | N                           | 73                                          | A                           | 216        |
| S70T, K73Q            | 70                                          | T                           | 73                                          | Q                           | 219        |
| S70T, R76A            | 70                                          | T                           | 76                                          | A                           | 246        |
| S70T, R76D            | 70                                          | T                           | 76                                          | D                           | 247        |
| S70T, R76E            | 70                                          | T                           | 76                                          | E                           | 248        |
| I71L, K73Q            | 71                                          | L                           | 73                                          | Q                           | 217        |
| I71L, R76A            | 71                                          | L                           | 76                                          | A                           | 227        |
| I71L, R76D            | 71                                          | L                           | 76                                          | D                           | 228        |
| I71L, R76E            | 71                                          | L                           | 76                                          | E                           | 229        |
| K72A, K73Q            | 72                                          | A                           | 73                                          | Q                           | 218        |
| K72A, R76A            | 72                                          | A                           | 76                                          | A                           | 230        |
| K72A, R76D            | 72                                          | A                           | 76                                          | D                           | 231        |
| K72A, R76E            | 72                                          | A                           | 76                                          | E                           | 232        |
| K73A, R76A            | 73                                          | A                           | 76                                          | A                           | 233        |
| K73A, R76D            | 73                                          | A                           | 76                                          | D                           | 234        |
| K73A, R76E            | 73                                          | A                           | 76                                          | E                           | 235        |

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 213-219 и 227-248. В иллюстративных аспектах IL-21 содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризующуюся более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с одной из последовательностей под SEQ ID NO: 213-219 и 227-248.

#### *Длина пептида*

Мутеины IL-21, описанные в данном документе, могут содержать пептидный остов из любого количества аминокислот, т. е. могут иметь любую длину пептида. В некоторых вариантах осуществления пептиды, описанные в данном документе, имеют приблизительно такую же длину, как SEQ ID NO: 1, т. е. имеют длину 133 ( $\pm$  от приблизительно 1 до приблизительно 20,  $\pm$  от приблизительно 1 до приблизительно 15,  $\pm$  от приблизительно 1 до приблизительно 10 или  $\pm$  от приблизительно 1 до приблизительно 5) аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления раскрытый в настоящем изобретении пептид имеет длину более 133 аминокислот благодаря тому, что он слит с другой полипептидной цепью, например, тяжелой цепью антитела, содержащей от приблизительно 400 до приблизительно 600 аминокислот, легкой цепью антитела, содержащей от приблизительно 150 до приблизительно 300 аминокислот, как далее описано в данном документе.

#### *Дополнительные модификации пептидов*

В альтернативных или дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения мутеин IL-21 является липидизированным (например, миристоилированным, пальмитоилированным), гликозилированным, амидированным, карбоксилированным, фосфорилированным, этерифицированным, ацилированным, ацетилированным, циклизированным или превращенным в соль присоединения кислоты и/или необязательно димеризованным или полимеризованным или конъюгированным, как далее описано в данном документе.

#### *Фармацевтически приемлемые соли*

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 находится в форме соли, например, фармацевтически приемлемой соли. Такие соли можно получать *in situ* во время конечного выделения и очистки мутеина IL-21 или получать отдельно посредством реакции свободной основной функциональной группы с подходящей кислотой. Примеры кислот, которые можно использовать для образования фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты, включают, например, неорганическую кислоту, например, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту и фосфорную кислоту, и

органическую кислоту, например, щавелевую кислоту, малеиновую кислоту, янтарную кислоту и лимонную кислоту.

Иллюстративные соли присоединения кислоты включают без ограничения ацетат, адипат, альгинат, цитрат, аспартат, бензоат, бензолсульфонат, бисульфат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, диглюконат, глицерофосфат, гемисульфат, гептаноат, гексаноат, фумарат, гидрохлорид, гидробромид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат (изетионат), лактат, малеат, метансульфонат, никотинат, 2-нафталинсульфонат, оксалат, пальмитоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, пикрат, пивалат, пропионат, сукцинат, тартрат, тиоцианат, фосфат, глутамат, бикарбонат, п-толуолсульфонат и ундеканат.

Соли присоединения основания также можно получать *in situ* во время конечного выделения и очистки мутеина IL-21 или посредством реакции фрагмента, содержащего карбоновую кислоту, с подходящим основанием, таким как гидроксид, карбонат или бикарбонат фармацевтически приемлемого катиона металла, или с аммиаком или органическим первичным, вторичным или третичным амином. Фармацевтически приемлемые соли включают без ограничения соли на основе катионов щелочных металлов или щелочноземельных металлов, такие как соли лития, натрия, калия, кальция, магния и алюминия и т. п., и нетоксичных катионов четвертичного аммония и аминов, в том числе, помимо прочего, аммония, тетраметиламмония, тетраэтиламмония, метиламмония, диметиламмония, триметиламмония, триэтиламмония, диэтиламмония и этиламмония. Другие иллюстративные органические амины, применимые для образования солей присоединения основания, включают, например, этилендиамин, этаноламин, диэтанолламин, пиперидин, пиперазин и т. п.

Дополнительно, основные азотсодержащие группы можно кватернизировать с помощью таких активных средств, как низшие алкилгалогениды, такие как метил-, этил-, пропил- и бутилхлориды, бромиды и йодиды; длинноцепочечные галогениды, такие как децил-, лаурил-, миристил- и стеарилхлориды, бромиды и йодиды; арилалкилгалогениды, такие как бензил- и фенэтилбромиды, и другие. Таким образом получают продукты, растворимые или диспергируемые в воде или масле.

#### *Очистка*

Мутеины IL-21 по настоящему изобретению можно очищать. Используемый в данном документе термин "очищенный" означает имеющий повышенную чистоту, где "чистота" является относительным термином и не обязательно подразумевает абсолютную чистоту. В иллюстративных аспектах чистота соединения (например, в композиции) составляет по меньшей мере или приблизительно 50%, по меньшей мере или приблизительно 60%, по меньшей мере или приблизительно 70%, по меньшей мере или приблизительно 80%, по меньшей мере или приблизительно 90%, по меньшей мере или приблизительно 95% или по меньшей мере или приблизительно 98% или составляет приблизительно 100%.

#### *Пептидомиметики*

В некоторых аспектах мутеин IL-21 представляет собой пептидомиметик, или по меньшей мере часть мутеина представляет собой пептидомиметик. Пептидомиметики, а также способы их получения известны из уровня техники. См., например, Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics, Volumes 1 и 2, ed., Abell, A., JAI Press Inc., Greenwich, CT, 2006. В некоторых аспектах пептидомиметик представляет собой D-пептидный пептидомиметик, содержащий D-изомеры аминокислот. В некоторых аспектах пептидомиметик представляет собой пептоид, в котором боковая цепь аминокислоты присоединена к альфа-атому азота пептидного остова. Способы получения пептоидов известны из уровня техники. См., например, Zuckermann et al., *JACS* 114(26): 10646-10647 (1992) и Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Peptoids, Fowler, Sarah, University of Wisconsin-Madison, 2008. В некоторых аспектах пептидомиметик представляет собой  $\beta$ -пептид, содержащий  $\beta$ -аминокислоты, аминогруппы которых связаны с  $\beta$ -атомом углерода, а не с альфа-атомом углерода. Способы получения  $\beta$ -пептидов известны из уровня техники. См., например, Seebach et al., *Helvetica Chimica Acta* 79(4): 913-941 (1996).

#### *Характеристики связывания*

В иллюстративных вариантах осуществления мутеины IL-21 связываются с рецептором IL-21 (IL-21R) со сниженной аффинностью по сравнению с аффинностью IL-21 дикого типа к IL-21R. В иллюстративных вариантах осуществления мутеины IL-21 связываются с IL-21R человека со сниженной аффинностью по сравнению с аффинностью IL-21 человека дикого типа к IL-21R человека. В иллюстративных вариантах осуществления мутеины IL-21 связываются с альфа-цепью IL-21R человека со сниженной аффинностью по сравнению с аффинностью IL-21 человека дикого типа к альфа-цепи IL-21R человека. В конкретных вариантах осуществления мутеины IL-21, которые связываются с альфа-цепью IL-21R человека со сниженной аффинностью по сравнению с аффинностью IL-21 человека дикого типа к альфа-цепи IL-21R человека, содержат одну, две или более замен, находящихся в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из 5, 8, 9, 12, 13, 16, 19, 23, 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, и 80, в соответствии с нумерацией аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1. Конкретные аминокислотные замены, которые можно осуществлять в таких положениях, обсуждаются в данном документе (см., например, таблицы А, В и С).

В иллюстративных вариантах осуществления мутеины IL-21 связываются с гамма-цепью IL-21R человека со сниженной аффинностью по сравнению с аффинностью IL-21 человека дикого типа к гамма-цепи IL-21R человека. В конкретных вариантах осуществления мутеины IL-21, которые связываются с гамма-цепью IL-21R человека со сниженной аффинностью по сравнению с аффинностью IL-21 человека дикого типа к гамма-цепи IL-21R человека, содержат одну, две или более замен, находящихся в аминокислотном положении, выбранном из группы, состоящей из 11, 14, 15, 109, 110, 112, 113, 116, 117, 119, 120 и 123 в соответствии с нумерацией аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1. Конкретные аминокислотные замены, которые можно осуществлять в таких положениях, обсуждаются в данном документе (см., например, таблицы А, В и С).

В иллюстративных вариантах осуществления мутеины IL-21 связываются с гамма-цепью IL-21R человека со сниженной аффинностью по сравнению с аффинностью IL-21 человека дикого типа к альфа-цепи IL-21R человека. В иллюстративных вариантах осуществления мутеины IL-21 связываются с IL-21R яванского макака со сниженной аффинностью по сравнению с аффинностью IL-21 яванского макака дикого типа к IL-21R яванского макака. В иллюстративных вариантах осуществления мутеины IL-21 связываются с альфа-цепью IL-21R яванского макака со сниженной аффинностью по сравнению с аффинностью IL-21 яванского макака дикого типа к альфа-цепи IL-21R яванского макака. В иллюстративных вариантах осуществления мутеины IL-21 связываются с гамма-цепью IL-21R яванского макака со сниженной аффинностью по сравнению с аффинностью IL-21 яванского макака дикого типа к гамма-цепи IL-21R яванского макака. В иллюстративных вариантах осуществления мутеины IL-21 связываются с гамма-цепью IL-21R яванского макака со сниженной аффинностью по сравнению с аффинностью IL-21 яванского макака дикого типа к альфа-цепи IL-21R яванского макака.

Мутеины IL-21, предусмотренные в данном документе, связываются с IL-21R нековалентным и обратимым способом. В иллюстративных вариантах осуществления прочность связывания мутеинов с IL-21R может быть описана с точки зрения их аффинности, меры прочности взаимодействия между связывающим участком мутеина и IL-21R. В иллюстративных аспектах мутеины IL-21, предусмотренные в данном документе, характеризуются высокой аффинностью к IL-21R и, таким образом, будут связывать большее количество IL-21R за более короткий период времени, чем мутеины IL-21 с низкой аффинностью. В иллюстративных аспектах мутеины IL-21, предусмотренные в данном документе, характеризуются низкой аффинностью к IL-21R и, таким образом, будут связывать меньшее количество IL-21R за более длительный период времени, чем мутеины IL-21 с высокой аффинностью. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 имеет равновесную константу ассоциации КА, которая составляет по меньшей мере  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , по меньшей мере  $10^9 \text{ M}^{-1}$  или по меньшей мере  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ . Как понятно среднему специалисту в данной области, КА может быть подвержена влиянию факторов, в том числе pH, температуры и состава буфера.

В иллюстративных вариантах осуществления прочность связывания мутеина IL-21 с IL-21R может быть описана с точки зрения его чувствительности.  $K_D$  представляет собой равновесную константу диссоциации, соотношение  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  между мутеином IL-21 и IL-21R.  $K_D$  и КА обратно пропорциональны друг другу. Значение  $K_D$  относится к концентрации мутеина (количеству мутеина, необходимому для конкретного эксперимента), и, таким образом, чем ниже значение  $K_D$  (чем ниже необходимая концентрация), тем выше аффинность мутеина. В иллюстративных аспектах прочность связывания мутеина IL-21 с IL-21R может быть описана с точки зрения  $K_D$ . В иллюстративных аспектах  $K_D$  мутеинов IL-21, предусмотренных в данном документе, составляет приблизительно  $10^{-1} \text{ M}$ ,

приблизительно  $10^{-2}$  М, приблизительно  $10^{-3}$  М, приблизительно  $10^{-4}$  М, приблизительно  $10^{-5}$  М, приблизительно  $10^{-6}$  М или меньше. В иллюстративных аспектах  $K_D$  мутеинов IL-21, предусмотренных в данном документе, является микромолярной, наномолярной, пикомолярной или фемтомолярной. В иллюстративных аспектах  $K_D$  мутеинов IL-21, предусмотренных в данном документе, находится в пределах диапазона от приблизительно  $10^{-4}$  до  $10^{-6}$  М, или от  $10^{-7}$  до  $10^{-9}$  М, или от  $10^{-10}$  до  $10^{-12}$  М, или от  $10^{-13}$  до  $10^{-15}$  М. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 связывается с IL-21R человека с  $K_D$ , которая превышает или равняется приблизительно 0,04 нМ. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 связывается с IL-21R человека с  $K_D$ , составляющей от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 20 нМ, от 0,02 нМ до 20 нМ, от 0,05 нМ до 20 нМ, от 0,05 нМ до 15 нМ, от 0,1 нМ до 15 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 10 нМ или от 5 нМ до 10 нМ. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 связывается с IL-21R яванского макака с  $K_D$ , которая превышает или равняется приблизительно 0,055 нМ. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 связывается с IL-21R яванского макака с  $K_D$ , составляющей от приблизительно 0,01 нМ до приблизительно 20 нМ, от 0,02 нМ до 20 нМ, от 0,05 нМ до 20 нМ, от 0,05 нМ до 15 нМ, от 0,1 нМ до 15 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 10 нМ или от 5 нМ до 10 нМ.

В иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 демонстрирует снижение аффинности связывания с  $\alpha$ -цепью IL-21R. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 представляет собой мутеин (например, одинарный или двойной), который демонстрирует приблизительно 2-, 5-, 10-, 15-, 20-, 25-, 30-, 35-, 40-, 45-, 50-, 55-, 60-, 65-, 70-, 75-, 80-, 85-, 90-, 95-, 100-, 105-, 110-, 115-, 120-, 125-, 130-, 135-, 140-, 145-, 150-, 175-, 200-, 225-, 250-, 275-, 300-, 325-, 350-, 375-, 400-, 425-, 450-, 475-, 500-, 525-, 550-, 575-, 600-, 625-, 650-, 675-, 700-, 725-, 750-, 775-, 800-, 825-, 850-, 875-, 900-, 925-, 950-, 975-кратное, 1000-кратное или большее снижение аффинности связывания с  $\alpha$ -цепью IL-21R. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 представляет собой двойной мутеин, демонстрирующий снижение аффинности связывания с  $\alpha$ -цепью IL-21R.

В иллюстративных аспектах вышеуказанное снижение аффинности связывания мутеина IL-21 (например, одинарного или двойного мутеина) приводит к снижению аффинности к  $\alpha$ -цепи IL-21R по сравнению с аффинностью IL-21 человека дикого типа к  $\alpha$ -цепи IL-21R, составляющей приблизительно 0,025 нМ. Соответственно, 2-кратное снижение аффинности, рассмотренное выше, будет приводить к тому, что аффинность мутеина IL-21 к  $\alpha$ -цепи IL-21R будет составлять приблизительно 0,05 нМ. Таким образом, в иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 (например, одинарный или двойной) характеризуется аффинностью к  $\alpha$ -цепи IL-21R, составляющей приблизительно 0,05, 0,125, 0,25, 0,375, 0,5, 0,625, 0,75, 0,875, 1,0, 1,125, 1,25, 1,375, 1,5, 1,625, 1,75, 1,875, 2,0, 2,125, 2,25, 2,375, 2,5, 2,625, 2,75, 2,875, 3,0, 3,125, 3,25, 3,375, 3,5, 3,625, 3,75, 4,375, 5, 5,625, 6,25, 6,875, 7,5, 8,125, 8,75, 9,375, 10,0, 10,625, 11,25, 11,875, 12,5, 13,125, 13,75, 14,375, 15,0, 15,625, 16,25, 16,875, 17,5, 18,125, 18,75, 19,375, 20,0, 20,625, 21,25, 21,875, 22,5, 23,125, 23,75, 24,375, 25 нМ или больше. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21

представляет собой двойной мутеин, демонстрирующий сниженную аффинность связывания с  $\alpha$ -цепью IL-21R.

В иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 демонстрирует снижение активности, измеренное с помощью анализа фосфорилирования STAT3 *in vitro*. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 представляет собой мутеин (например, одинарный или двойной), который демонстрирует приблизительно 2-, 5-, 10-, 15-, 20-, 25-, 30-, 35-, 40-, 45-, 50-, 55-, 60-, 65-, 70-, 75-, 80-, 85-, 90-, 95-, 100-, 105-, 110-, 115-, 120-, 125-, 130-, 135-, 140-, 145-, 150-, 175-, 200-, 225-, 250-, 275-, 300-, 325-, 350-, 375-, 400-, 425-, 450-, 475-, 500-, 525-, 550-, 575-, 600-, 625-, 650-, 675-, 700-, 725-, 750-, 775-, 800-, 825-, 850-, 875-, 900-, 925-, 950-, 975-кратное, 1000-кратное или большее снижение активности, измеренное с помощью анализа фосфорилирования STAT3. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 представляет собой двойной мутеин, демонстрирующий снижение активности, измеренное с помощью анализа фосфорилирования STAT3.

#### *Конъюгаты мутеина IL-21*

В настоящем изобретении также предусмотрены конъюгаты, содержащие один или несколько мутеинов IL-21 по настоящему изобретению, связанных с гетерологичным фрагментом. Используемый в данном документе термин "гетерологичный фрагмент" синонимичен термину "конъюгированный фрагмент" и относится к любой молекуле (химической или биохимической, встречающейся в природе или не кодируемой), которая отличается от мутеинов IL-21, описанных в данном документе. Иллюстративные конъюгированные фрагменты, которые могут быть связаны с любым из мутеинов IL-21, описанных в данном документе, включают без ограничения гетерологичный пептид или полипептид (в том числе, например, иммуноглобулин или его часть (например, вариабельную область, CDR или Fc-область)), нацеливающееся средство, диагностическую метку, такую как радиоактивный изотоп, флуорофор или ферментативная метка, полимер, в том числе водорастворимые полимеры, или другие терапевтические или диагностические средства. В некоторых вариантах осуществления предусмотрен конъюгат, содержащий мутеин IL-21 по настоящему изобретению и иммуноглобулин. Конъюгат в некоторых вариантах осуществления содержит один или несколько мутеинов IL-21, описанных в данном документе, и один или несколько из: пептида (который отличаются от мутеинов IL-21, описанных в данном документе), полипептида, молекулы нуклеиновой кислоты, антитела или его фрагмента, полимера, квантовой точки, малой молекулы, токсина, диагностического средства, углевода, аминокислоты.

В иллюстративных вариантах осуществления конъюгат по настоящему изобретению содержит мутеин IL-21, описанный в данном документе, и гетерологичный фрагмент, который представляет собой полипептид (например, полипептид, отличающийся от любого из мутеинов IL-21, описанных в данном документе), и конъюгат представляет собой слитый полипептид, или слитый белок, или химерный белок, или химерный полипептид. Дополнительные описания таких конъюгатов предусмотрены в данном документе в разделе "Слитые белки".

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный фрагмент присоединен посредством нековалентного или ковалентного связывания к мутеину IL-21 по настоящему изобретению. В иллюстративных аспектах связь между мутеином IL-21 и гетерологичным фрагментом достигается посредством ковалентных химических связей, например, пептидных связей, дисульфидных связей и т. п., или посредством физических сил, таких как электростатические, водородные, ионные, ван-дер-ваальсовы или гидрофобные или гидрофильные взаимодействия. Можно применять множество систем нековалентного связывания, в том числе, например, биотин-авидин, лиганд/рецептор, фермент/субстрат, нуклеиновая кислота/белок, связывающий нуклеиновую кислоту, липид/липидсвязывающий белок, партнеры молекул клеточной адгезии или любые партнеры по связыванию или их фрагменты, которые характеризуются аффинностью друг к другу.

В иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 связывается с конъюгированным фрагментом с помощью прямой ковалентной связи посредством реакции целевых аминокислотных остатков мутеина IL-21 с органическим дериватирующим средством, которое способно реагировать с выбранными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками этих целевых аминокислот. Реакционноспособные группы мутеина IL-21 или конъюгированного фрагмента включают, например, альдегидную группу, аминогруппу, сложноэфирную, тиольную,  $\alpha$ -галогенацетильную, малеимидную или гидразиновую группу. Дериватирующие средства включают, например, малеимидобензолсульфосукцинимидный сложный эфир (конъюгирование посредством остатков цистеина), N-гидроксисукцинимид (посредством остатков лизина), глутаровый альдегид, янтарный ангидрид или другие средства, известные из уровня техники. В качестве альтернативы, конъюгированные фрагменты могут быть связаны с мутеином IL-21 опосредованно посредством промежуточных носителей, таких как полисахаридные или полипептидные носители. Примеры полисахаридных носителей включают аминодекстран. Примеры подходящих полипептидных носителей включают полилизин, полиглутаминовую кислоту, полиаспарагиновую кислоту, их сополимеры и смешанные полимеры этих аминокислот и других, например, остатков серина, для придания желаемых свойств растворимости полученному в результате нагруженному носителю.

Цистеинильные остатки наиболее часто подвергают реакции с  $\alpha$ -галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота, хлорацетамид, с получением карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Цистеинильные остатки также дериватируют посредством реакции с бромтрифторацетоном, альфа-бром- $\beta$ (5-имидазоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, п-хлорртутьбензоатом, 2-хлорртуть-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Гистидильные остатки дериватируют посредством реакции с



диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, так как данное средство является относительно специфичным для боковой цепи гистидила. Также применимым является парабромфенацилбромид; реакцию предпочтительно проводят в 0,1 М какодилата натрия при pH 6,0.

Лизинильные и аминоконцевые остатки подвергают реакции с ангидридами янтарной или других карбоновых кислот. Дериватизация этими средствами имеет эффект изменения заряда лизинильных остатков на противоположный. Другие подходящие реагенты для дериватизации остатков, содержащих альфа-аминогруппу, включают сложные имидоэфиры, такие как метилпиколинимидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль, хлорборогидрид; тринитробензолсульфоновую кислоту; О-метилизомочевину; 2,4-пентандион и глиоксилат в реакции, катализируемой трансаминазой.

Аргинильные остатки модифицируют посредством реакции с одним или несколькими традиционными реагентами, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Для дериватизации остатков аргинина необходимо, чтобы реакцию проводили в щелочных условиях из-за высокого значения рКа гуанидиновой функциональной группы. Кроме того, эти реагенты могут реагировать с группами лизина, а также с epsilon-аминогруппой аргинина.

Специфическую модификацию тирозильных остатков можно проводить с особым интересом к введению спектральных меток в тирозильные остатки посредством реакции с ароматическими соединениями диазония или с тетранитрометаном. Для образования О-ацетилтирозильных соединений и 3-нитропроизводных чаще всего применяют соответственно N-ацетилимидизол и тетранитрометан.

Боковые карбоксильные группы (аспартильные или глутамильные) селективно модифицируют посредством реакции с карбодиимидами ( $R-N=C=N-R'$ ), где R и R' представляют собой различные алкильные группы, такие как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азоний-4,4-диметилпентил)карбодиимид. Кроме того, аспартильные и глутамильные остатки превращают в аспарагинильные и глутаминильные остатки посредством реакции с ионами аммония.

Другие модификации включают гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп сериальных или треонильных остатков, метилирование альфа-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (Т. Е. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), дезамидирование аспарагина или глутамина, ацетилирование N-концевого амина и/или амидирование или этерификация C-концевой группы карбоновой кислоты.

Другой тип ковалентной модификации включает химическое или ферментативное связывание гликозидов с мутеином IL-21. Сахар(сахара) может(могут) быть присоединен(присоединены) к (а) аргинину и гистидину, (б) свободным карбоксильным группам, (с) свободным сульфгидрильным группам, таким как свободные сульфгидрильные группы цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, таким как

свободные гидроксильные группы серина, треонина или гидроксипролина, (е) ароматическим остаткам, таким как ароматические остатки тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в WO87/05330, опубликованной 11 сентября 1987 г., и в Aplin и Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

В иллюстративных аспектах гетерологичный фрагмент присоединен к мутеину IL-21 по настоящему изобретению посредством линкера. В некоторых аспектах линкер содержит цепь атомов длиной от 1 до приблизительно 60 или от 1 до 30 атомов или длиннее, от 2 до 5 атомов, от 2 до 10 атомов, от 5 до 10 атомов или от 10 до 20 атомов. В некоторых вариантах осуществления все атомы цепи представляют собой атомы углерода. В некоторых вариантах осуществления атомы цепи остова линкера выбраны из группы, состоящей из C, O, N и S. Атомы цепи и линкеры можно выбирать в соответствии с их ожидаемой растворимостью (гидрофильностью) таким образом, чтобы получить более растворимый конъюгат. В некоторых вариантах осуществления в линкере предусмотрена функциональная группа, которая подвергается расщеплению посредством фермента или другого катализатора или гидролитических условий, обнаруживаемых в ткани-мишени, или органе-мишени, или клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления длина линкера является достаточно большой для уменьшения возможности стерического несоответствия. Если линкер представляет собой ковалентную связь или пептидную связь, а конъюгат представляет собой полипептид, то весь конъюгат может представлять собой слитый белок. Такие пептидные линкеры могут иметь любую длину. Иллюстративные пептидные линкеры имеют длину от приблизительно 1 до 50 аминокислот, имеют длину от 5 до 50, от 3 до 5, от 5 до 10, от 5 до 15 или от 10 до 30 аминокислот и являются гибкими или жесткими. В иллюстративных аспектах линкер представляет собой пептид, содержащий от приблизительно 2 до приблизительно 20 аминокислот. В иллюстративных аспектах линкер представляет собой пептид, содержащий от приблизительно 2 до приблизительно 15 аминокислот, от приблизительно 2 до приблизительно 10 аминокислот или от приблизительно 2 до приблизительно 5 аминокислот. Подходящие пептидные линкеры известны из уровня техники. См., например, Chen et al., Adv Drug Delivery Reviews 65(10): 1357-1369 (2013); Arai et al., Protein Eng Des Sel 14(8): 529-532 (2001); и Wriggers et al., Curr Trends in Peptide Science 80(6): 736-746 (2005). В иллюстративных аспектах линкер представляет собой пептид, содержащий аминокислотную последовательность GGGGS (SEQ ID NO: 262).

#### *Слитые белки*

В иллюстративных вариантах осуществления мутеин IL-21 связан с полипептидом, который отличается от любого из мутеинов IL-21, описанных в данном документе, и конъюгат представляет собой слитый полипептид, или слитый белок, или химерный белок, или химерный полипептид. Соответственно, в настоящем изобретении предусмотрены слитые полипептиды или слитые белки, содержащие мутеин IL-21 по настоящему изобретению и гетерологичный полипептид или пептид. В иллюстративных аспектах слитый белок по настоящему изобретению содержит мутеин IL-21 по настоящему

изобретению, связанный с антигенсвязывающим белком. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок представляет собой антитело или иммуноглобулин, или его антигенсвязывающий фрагмент антитела, или белковый продукт на основе антитела.

В совокупности антитела образуют семейство белков плазмы крови, известных как иммуноглобулины, и содержат домены иммуноглобулинов. (Janeway et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 4<sup>th</sup> ed., Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, 1999.) Используемый в данном документе термин "антитело" относится к белку в традиционном формате иммуноглобулина, содержащему тяжелые и легкие цепи и содержащему переменные и константные области. Например, антитело может представлять собой IgG, который имеет "Y-образную" структуру из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну "легкую" (как правило, имеющую молекулярную массу, составляющую приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (как правило, имеющую молекулярную массу, составляющую приблизительно 50-70 кДа). Антитело имеет переменную область и константную область. В форматах IgG переменная область обычно имеет приблизительно 100-110 или больше аминокислот, содержит три области, определяющие комплементарность (CDR), в первую очередь отвечает за распознавание антигена и существенно отличается среди других антител, которые связываются с различными антигенами. Константная область позволяет антителу привлекать клетки и молекулы иммунной системы. Переменная область состоит из N-концевых областей каждой легкой цепи и тяжелой цепи, тогда как константная область состоит из C-концевых частей каждой из тяжелых и легких цепей. (Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999)).

Общая структура и свойства CDR антител были описаны в уровне техники. Вкратце, в остоле антитела CDR заключены в пределах каркасной области в переменной области тяжелой и легкой цепей, где они составляют области, главным образом отвечающие за связывание и распознавание антигена. Переменная область, как правило, содержит по меньшей мере три CDR тяжелой или легкой цепей (Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Public Health Service N.I.H., Bethesda, Md.; см., также Chothia и Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al., 1989, *Nature* 342: 877-883) в пределах каркасной области (обозначенной как каркасные области 1-4, FR1, FR2, FR3 и FR4 согласно Kabat et al., 1991; см. также Chothia и Lesk, 1987, выше).

Антитела могут содержать любую константную область, известную из уровня техники. Легкие цепи человека классифицируют как легкие каппа- и лямбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируют как мю-, дельта-, гамма-, альфа- или эpsilon-цепи, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. IgG имеет несколько подклассов, в том числе без ограничения IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, в том числе без ограничения IgM1 и IgM2. Варианты осуществления настоящего изобретения включают все такие классы или изотипы антител. Константная область легкой цепи может представлять собой, например, константную область легкой цепи каппа- или

лямбда-типа, например, константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа человека. Константная область тяжелой цепи может представлять собой, например, константные области тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа, например, константную область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа человека. Соответственно, в иллюстративных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело изотипа IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, в том числе любое из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Антитело может представлять собой моноклональное антитело или поликлональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность, которая является существенно сходной с встречающимся в природе антителом, продуцируемым млекопитающим, например, мышью, кроликом, козой, лошастью, курицей, хомяком, человеком и т. п. В этом отношении антитело можно рассматривать как антитело млекопитающего, например, антитело мыши, антитело кролика, антитело козы, антитело лошади, антитело курицы, антитело хомяка, антитело человека и т. п. В определенных аспектах антитело представляет собой антитело человека. В определенных аспектах антитело представляет собой химерное антитело или гуманизированное антитело. Термин "химерное антитело" относится к антителу, содержащему домены из двух или более различных антител. Химерное антитело может, например, содержать константные домены от одного вида и переменные домены от второго или, в более общем случае, может содержать участки аминокислотной последовательности от по меньшей мере двух видов. Химерное антитело также может содержать домены двух или более различных антител от одного и того же вида. Термин "гуманизированное" при использовании в отношении антител относится к антителам, имеющим по меньшей мере области CDR из источника, отличного от человека, сконструированные таким образом, чтобы они имели структуру и иммунологическую функцию, более сходные с таковыми у настоящих антител человека, чем у антител из исходного источника. Например, гуманизация может включать прививание CDR из антитела, отличного от антитела человека, такого как антитело мыши, на антитело человека. Гуманизация также может включать селективные аминокислотные замены для получения последовательности, отличной от последовательности человека, более сходной с последовательностью человека.

Антитело можно расщеплять на фрагменты с помощью ферментов, таких как, например, папаин и пепсин. Папаин расщепляет антитело с образованием двух Fab-фрагментов и одного Fc-фрагмента. Пепсин расщепляет антитело с образованием F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента и pFc'-фрагмента. В иллюстративных аспектах настоящего изобретения слитый белок по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела. Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающий фрагмент антитела" относится к части молекулы антитела, которая способна к связыванию антигена антитела и также известна как "антигенсвязывающий фрагмент" или "антигенсвязывающая часть". В иллюстративных примерах антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой Fab-фрагмент или F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент.

Архитектуру антител использовали для создания растущего спектра альтернативных форматов, который охватывает диапазон молекулярных масс по меньшей мере приблизительно 12-150 кДа и характеризуется диапазоном валентности ( $n$ ) от мономерных ( $n=1$ ), до димерных ( $n=2$ ), до тримерных ( $n=3$ ), до тетрамерных ( $n=4$ ) и потенциально более высокого порядка; такие альтернативные форматы в данном документе называются "белковыми продуктами на основе антител". Белковые продукты на основе антител включают белковые продукты на основе структуры полного антитела и белковые продукты, которые имитируют фрагменты антитела, сохраняющие полную антигенсвязывающую способность, например, scFv, Fab и VHH/VN (обсуждаемые ниже). Наименьшим антигенсвязывающим фрагментом антитела, который сохраняет свой полный антигенсвязывающий участок, является Fv-фрагмент, который полностью состоит из переменных (V) областей. Растворимый гибкий аминокислотный пептидный линкер используют для соединения V-областей в scFv-фрагмент (одноцепочечный переменный фрагмент) для стабилизации молекулы, или к V-областям добавляют константные (C) домены с получением Fab-фрагмента [антигенсвязывающего фрагмента]. Как scFv-, так и Fab-фрагменты могут быть легко получены в клетках-хозяевах, например, прокариотических клетках-хозяевах. Другие белковые продукты на основе антител включают scFv, стабилизированный дисульфидными связями (ds-scFv), одноцепочечный Fab (scFab), а также ди- и мультимерные форматы антител, такие как диа-, триа- и тетратела, или миниантитела (мини-Ab), которые включают различные форматы, состоящие из scFv, связанных с олигомеризационными доменами. Наименьшие фрагменты представляют собой VHH/VN из тяжелой цепи Ab верблюда, а также однодоменные Ab (sdAb). Структурным элементом, который чаще всего используется для создания новых форматов антитела, является фрагмент антитела, представляющий собой одноцепочечный переменный (V) домен (scFv), который содержит V-домены из тяжелой и легкой цепей (домены VH и VL), связанные с помощью пептидного линкера из ~ 15 аминокислотных остатков. Пептидное антитело или продукт слияния пептид-Fc представляют собой еще один белковый продукт на основе антитела. Структура пептидного антитела состоит из биологически активного пептида, привитого на Fc-домен. Пептидные антитела хорошо описаны в уровне техники. См., например, Shimamoto et al., *mAbs* 4(5): 586-591 (2012).

Другие белковые продукты на основе антител включают одноцепочечное антитело (SCA); диатело; триатело; тетратело; биспецифические или триспецифические антитела и т. п. Биспецифические антитела можно разделить на пять основных классов: BsIgG, присоединенные IgG, фрагменты BsAb, биспецифические слитые белки и конъюгаты BsAb. См., например, Spiess et al., *Molecular Immunology* 67(2) Part A: 97-106 (2015).

В иллюстративных аспектах слитый белок по настоящему изобретению содержит любой из таких белковых продуктов на основе антител. В иллюстративных аспектах слитый белок по настоящему изобретению содержит любое из scFv, Fab, VHH/VN, Fv-фрагмента, ds-scFv, scFab, димерного антитела, мультимерного антитела (например, диатела, триатела, тетратела), мини-Ab, пептидного антитела, VHH/VN тяжелой цепи антитела верблюда,

sdAb, диатела; триатела; тетратела; биспецифического или триспецифического антитела, BsIgG, присоединенного IgG, фрагмента BsAb, биспецифического слитого белка и конъюгата BsAb.

В иллюстративных примерах слитый белок по настоящему изобретению содержит белковый продукт на основе антитела в мономерной форме или полимерной, олигомерной или мультимерной форме. В определенных вариантах осуществления, в которых антитело содержит две или более различные области, представляющие собой антигенсвязывающие фрагменты, антитело считается биспецифическим, триспецифическим или мультиспецифическим или двухвалентным, трехвалентным или поливалентным в зависимости от количества различных эпитопов, которые распознаются и связываются антителом.

В иллюстративных вариантах осуществления антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела связываются с опухолевым антигеном. В иллюстративных аспектах опухолевый антиген представляет собой антиген, полученный из вирусного белка, антиген, полученный в результате точечных мутаций, или антиген, кодируемый раковым геном зародышевого типа. В иллюстративных аспектах опухолевый антиген представляет собой p53, KRAS, NRAS, MAGEA, MAGEB, MAGEC, BAGE, GAGE, LAGE/NY-ESO1, SSX, тирозиназу, gp100/pmel17, Melan-A/MART-1, gp75/TRP1, TRP2, CEA, RAGE-1, HER2/NEU, WT1. В иллюстративных аспектах антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела в слитом белке по настоящему изобретению связываются со средством иммунотерапии или представляют собой средство иммунотерапии, как описано в данном документе. В иллюстративных аспектах антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела в слитом белке по настоящему изобретению связываются с цитокином, лимфокином, фактором роста или гемопоэтическим фактором, как описано в данном документе.

В иллюстративных вариантах осуществления слитый белок по настоящему изобретению содержит цитокин (например, мутеин IL-21, описанный в данном документе) и антитело, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела, которые связываются с белком сигнального пути контрольной точки иммунного ответа, опухолевым антигеном, цитокином, лимфокином, фактором роста или другим гемопоэтическим фактором, в том числе без ограничения любым из факторов, описанных в данном документе. В иллюстративных вариантах осуществления слитый белок по настоящему изобретению содержит цитокин (например, мутеин IL-21, описанный в данном документе) и антитело, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела, которые связываются с белком сигнального пути контрольной точки иммунного ответа, выбранным из группы, состоящей из CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, CEACAM-1, TIGIT, LAG3, CD112, CD112R, CD96, TIM3, BTLA, или костимулирующим рецептором ICOS, OX40, 41BB, CD27, GITR.

В других вариантах осуществления слитый белок по настоящему изобретению

содержит цитокин и антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела), который связывается с белком сигнального пути контрольной точки иммунного ответа. Подходящие цитокины включают, например, цитокины, которые усиливают ответы по Th1-типу; и цитокины, которые активируют STAT 1, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой интерлейкин. В других вариантах осуществления цитокин представляет собой интерлейкин, который усиливает Т-клеточную активность, такой как, например, IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15 или IL-21. Такие цитокины могут быть модифицированы (например, посредством мутаций) для ослабления их аффинности в отношении их соответствующего рецептора. Такие мутации могут демонстрировать улучшенные профили безопасности благодаря уменьшению нецелевых и нежелательных взаимодействий. Таким образом, цитокины могут быть модифицированы с получением мутантов IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15 или IL-21. В конкретном варианте осуществления цитокин представляет собой мутант IL-21, описанный в данном документе. Подходящие антитела (или их антигенсвязывающие фрагменты антител), которые связываются с белком сигнального пути контрольной точки иммунного ответа, включают, например, антитела, которые связывают CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, TIGIT, LAG3, CD112, TIM3, VISTA или костимулирующий рецептор ICOS, OX40, HVEM или GITR. В конкретном варианте осуществления антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) связывается с PD-1 (например, с PD-1 человека).

В других вариантах осуществления слитый белок по настоящему изобретению представляет собой полиспецифический слитый белок, который содержит цитокин, антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) и по меньшей мере один дополнительный нацеливающий фрагмент. Например, слитый белок по настоящему изобретению может представлять собой триспецифический слитый белок, который содержит цитокин, антитело (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) и один дополнительный нацеливающий фрагмент.

В иллюстративных вариантах осуществления слитый белок по настоящему изобретению содержит мутант IL-21, описанный в данном документе, и антагонист связывания PD-1. Термин "антагонист связывания PD-1" относится к молекуле, которая уменьшает, блокирует, ингибирует, прекращает передачу сигнала, происходящую в результате взаимодействия PD-1 с одним или несколькими его партнерами по связыванию, такими как PD-L1, PD-L2, или препятствует ей. В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой молекулу, которая ингибирует связывание PD-1 с одним или несколькими его партнерами по связыванию. В конкретном аспекте антагонист связывания PD-1 ингибирует связывание PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2. Например, антагонисты связывания PD-1 включают антитела к PD-1, их антигенсвязывающие фрагменты антител, иммуноадгезины, слитые белки, олигопептиды и другие молекулы, которые уменьшают, блокируют, ингибируют, прекращают передачу сигнала, происходящую в результате взаимодействия PD-1 с PD-L1 и/или PD-L2, или препятствуют ей. В одном варианте осуществления антагонист связывания PD-1 ослабляет

отрицательный костимулирующий сигнал, опосредуемый или передаваемый белками клеточной поверхности, экспрессирующимися на Т-лимфоцитах и опосредующими передачу сигнала с помощью PD-1, так, что он делает дисфункциональную Т-клетку менее дисфункциональной (например, с усилением ответов эффекторов на распознавание антигена). В некоторых вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 представляет собой антитело к PD-1. Примеры антител к PD-1 включают ниволумаб (BMS-936558), пембролизумаб (MK-3475), BMS 936558, BMS-936559, TSR-042 (Tesarо), ePDR001 (Novartis) и пидилизумаб (CT-011). Дополнительные конкретные примеры антагонистов связывания PD-1 представлены ниже.

В иллюстративных вариантах осуществления антагонист связывания PD-1 содержит антигенсвязывающий белок, который связывается с PD-1, по сути состоит из него или состоит из него. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела, которые связываются с PD-1.

В иллюстративных аспектах слитый белок по настоящему изобретению содержит мутеин IL-21, описанный в данном документе, и антитело к PD-1 (описанное в данном документе), его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 представляет собой моноклональный IgG. В иллюстративных примерах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 являются одновалентными или двухвалентными. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 связываются с PD-1 человека, который имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 263. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 связываются с PD-1 яванского макака, который имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 264. В иллюстративных примерах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 связываются как с PD-1 человека, так и с PD-1 яванского макака. В иллюстративных примерах слитый белок по настоящему изобретению содержит мутеин IL-21 (описанный в данном документе) и антитело к PD-1 (описанное в данном документе).

В иллюстративных вариантах осуществления прочность связывания антитела к PD-1, его антигенсвязывающего фрагмента антитела или белкового продукта на основе антитела к PD-1 с PD-1 может быть описана с точки зрения  $K_D$ . В иллюстративных аспектах  $K_D$  антитела к PD-1, его антигенсвязывающего фрагмента антитела или белкового продукта на основе антитела к PD-1, предусмотренных в данном документе, составляет приблизительно  $10^{-1}$  М, приблизительно  $10^{-2}$  М, приблизительно  $10^{-3}$  М, приблизительно  $10^{-4}$  М, приблизительно  $10^{-5}$  М, приблизительно  $10^{-6}$  М, приблизительно  $10^{-7}$  М, приблизительно  $10^{-8}$  М, приблизительно  $10^{-9}$  М или меньше. В иллюстративных аспектах  $K_D$  антитела к PD-1, его антигенсвязывающего фрагмента антитела или белкового продукта



на основе антитела к PD-1, предусмотренных в данном документе, является микромолярной, наномолярной, пикомолярной или фемтомолярной. В иллюстративных аспектах  $K_D$  антитела к PD-1, его антигенсвязывающего фрагмента антитела или белкового продукта на основе антитела к PD-1, предусмотренных в данном документе, находится в диапазоне от приблизительно  $10^{-4}$  до  $10^{-6}$  М, или от  $10^{-7}$  до  $10^{-9}$  М, или от  $10^{-10}$  до  $10^{-12}$  М, или от  $10^{-13}$  до  $10^{-15}$  М. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 характеризуются высокой аффинностью в отношении PD-1 человека, PD-1 яванского макака или их обоих. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 имеют  $K_D$  в отношении PD-1 человека, составляющую менее 100 пМ, необязательно от приблизительно 1 пМ до приблизительно 50 пМ. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 имеют  $K_D$  в отношении PD-1 человека, находящуюся в диапазоне от приблизительно 1 пМ до приблизительно 20 пМ или составляющую менее чем приблизительно 10 пМ. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 имеет  $K_D$  в отношении PD-1 яванского макака, составляющую менее 100 пМ, необязательно от приблизительно 1 пМ до приблизительно 75 пМ. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 имеют  $K_D$  в отношении PD-1 яванского макака, находящуюся в диапазоне от приблизительно 1 пМ до приблизительно 20 пМ или составляющую менее чем 10 пМ.

В иллюстративных примерах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 являются антагонистом связывания PD-1, который уменьшает, блокирует, ингибирует, прекращает передачу сигнала, происходящую в результате взаимодействия PD-1 с одним или несколькими его партнерами по связыванию, такими как PD-L1, PD-L2, или препятствует ей. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 блокируют связывание PD-1 с его лигандом PD-L1 или PD-L2. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 ингибируют по меньшей мере 50% связывающих взаимодействий между PD-1 и PD-L1 или PD-L2. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 демонстрируют по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, или по меньшей мере приблизительно 70% ингибирование связывающего взаимодействия между PD-1 и PD-L1 или PD-L2.

В иллюстративных примерах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 ингибируют опосредованное PD-1 продуцирование IL-2 Т-клетками в реакции смешанной культуры лимфоцитов (MLR).

В иллюстративных аспектах  $IC_{50}$  антитела к PD-1, его антигенсвязывающего фрагмента антитела или белкового продукта на основе антитела к PD-1 в MLR находится в диапазоне от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 5 нМ. В иллюстративных аспектах  $IC_{50}$  антитела к PD-1, его антигенсвязывающего фрагмента антитела или белкового продукта на основе антитела к PD-1 в MLR составляет менее 2 нМ или менее 1 нМ. В иллюстративных аспектах  $IC_{50}$  антитела к PD-1, его антигенсвязывающего фрагмента антитела или белкового продукта на основе антитела к PD-1 в MLR составляет от приблизительно 0,5 нМ до приблизительно 2 нМ.

В иллюстративных примерах антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит (а) аминокислотную последовательность области 1, определяющей комплементарность (CDR), тяжелой цепи (HC), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, и 382, (см. таблицу D), или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, и 383, (см. таблицу D), или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (c) аминокислотную последовательность CDR3 HC, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, и 384, (см. таблицу D), или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (d) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC), выбранную из группы, состоящей из 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375, и 385 (см. таблицу D), или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (e) аминокислотную последовательность CDR2 LC, выбранную из группы, состоящей из 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, и 386 (см. таблицу D), или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (f) аминокислотную последовательность CDR3 LC, выбранную из группы, состоящей из: 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, и 387, (см. таблицу D), или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; или (g) комбинацию любых двух, трех, четырех, пяти или шести из (a)-(f). В некоторых вариантах осуществления белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержит такие CDR.

ТАБЛИЦА D

|         | <b>20A<br/>2</b> | <b>20C<br/>1</b> | <b>22D<br/>4</b> | <b>20C1.006</b> | <b>20C1.009</b> | <b>20A2.003</b> | <b>22D4.006</b> | <b>22D4.017</b> |
|---------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| CDR1 HC | 312              | 322              | 332              | 342             | 352             | 362             | 372             | 382             |
| CDR2 HC | 313              | 323              | 333              | 343             | 353             | 363             | 373             | 383             |
| CDR3 HC | 314              | 324              | 334              | 344             | 354             | 364             | 374             | 384             |
| CDR1 LC | 315              | 325              | 335              | 345             | 355             | 365             | 375             | 385             |
| CDR2 LC | 316              | 326              | 336              | 346             | 356             | 366             | 376             | 386             |
| CDR3 LC | 317              | 327              | 337              | 347             | 357             | 367             | 377             | 387             |

Число означает соответствующий SEQ ID NO.

В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит аминокислотную последовательность CDR1 LC, аминокислотную последовательность CDR2 LC и аминокислотную последовательность CDR3 LC, приведенные в таблице D, и по меньшей мере 1 или 2 из аминокислотных последовательностей CDR HC, приведенных в таблице D. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит аминокислотную последовательность CDR1 HC, аминокислотную последовательность CDR2 HC и аминокислотную последовательность CDR3 HC, приведенные в таблице D, и по меньшей мере 1 или 2 из аминокислотных последовательностей CDR LC, приведенных в таблице D. В некоторых вариантах осуществления белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержит такие CDR.

В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит 3, 4, 5 или все 6 аминокислотных последовательностей, представленных под SEQ ID NO: в одном столбце таблицы D. В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит каждую из аминокислотных последовательностей CDR LC, представленных под SEQ ID NO: в одном столбце таблицы D, и по меньшей мере 1 или 2 из аминокислотных последовательностей CDR HC, представленных под SEQ ID NO: в том же одном столбце или другом одном столбце таблицы D. В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит каждую из аминокислотных последовательностей CDR HC, представленных под SEQ ID NO: в одном столбце таблицы D, и по меньшей мере 1 или 2 из аминокислотных последовательностей CDR LC, представленных под SEQ ID NO: в том же одном столбце или другом одном столбце таблицы D. В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит шесть аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из (a) SEQ ID NOs: 312-317; (b) SEQ ID NOs: 322-327; (c) SEQ ID NOs: 332-337; (d) SEQ ID NOs: 342-347; (e) SEQ ID NOs: 352-357; (f) SEQ ID NOs: 362-367; (g) SEQ ID NOs: 372-377; и (h) SEQ ID NOs: 382-387. В конкретных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит все 6 аминокислотных

последовательностей CDR в таблице D в случае с любым из антител 20A2, 20C1, 22D4, 20C1.006, 20C1.009, 20A2.003, 22D4.006 или 22D4.017. В некоторых вариантах осуществления белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержит такие CDR.

В иллюстративных примерах аминокислотные последовательности из таблицы D разделены по меньшей мере одной или несколькими (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) промежуточными аминокислотами. В иллюстративных примерах между последовательностями CDR1 LC и CDR2 LC находится от приблизительно 10 до приблизительно 20 аминокислот, и между последовательностями CDR2 LC и CDR3 LC находится от приблизительно 25 до приблизительно 40 аминокислот. В иллюстративных примерах между последовательностями CDR1 LC и CDR2 LC находится от приблизительно 14 до приблизительно 16 аминокислот, и между последовательностями CDR2 LC и CDR3 LC находится от приблизительно 30 до приблизительно 35 аминокислот. В иллюстративных примерах между последовательностями CDR1 HC и CDR2 HC находится от приблизительно 10 до приблизительно 20 аминокислот, и между последовательностями CDR2 HC и CDR3 HC находится от приблизительно 25 до приблизительно 40 аминокислот. В иллюстративных примерах между последовательностями CDR1 HC и CDR2 HC находится от приблизительно 14 до приблизительно 16 аминокислот, и между последовательностями CDR2 HC и CDR3 HC находится от приблизительно 30 до приблизительно 35 аминокислот.

В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит (а) аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из 318, 328, 338, 348, 358, 368, 378, и 388 (см. таблицу E), или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; или (b) аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из 319, 329, 339, 349, 359, 369, 379 и 389 (см. таблицу E), или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; или (c) обе из (a) и (b). В некоторых вариантах осуществления белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержит такие вариабельные области.

ТАБЛИЦА E

|                                         | <b>20A<br/>2</b> | <b>20C<br/>1</b> | <b>22D<br/>4</b> | <b>20C1.00<br/>6</b> | <b>20C1.00<br/>9</b> | <b>20A2.00<br/>3</b> | <b>22D4.00<br/>6</b> | <b>22D4.01<br/>7</b> |
|-----------------------------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>ВАРИАБЕЛЬ<br/>НАЯ<br/>ОБЛАСТЬ HC</b> | 318              | 328              | 338              | 348                  | 358                  | 368                  | 378                  | 388                  |
| <b>ВАРИАБЕЛЬ</b>                        | 319              | 329              | 339              | 349                  | 359                  | 369                  | 379                  | 389                  |

|                        |     |     |     |     |     |     |     |     |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| НАЯ<br>ОБЛАСТЬ LC      |     |     |     |     |     |     |     |     |
| НС<br>(полноразмерная) | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 |
| LC<br>(полноразмерная) | 321 | 331 | 341 | 351 | 361 | 371 | 381 | 391 |

Число означает соответствующий SEQ ID NO.

В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит пару аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO: 318 и 319; (b) SEQ ID NO: 328 и 329; (c) SEQ ID NO: 338 и 339; (d) SEQ ID NO: 348 и 349; (e) SEQ ID NO: 358 и 359; (f) SEQ ID NO: 368 и 369; (g) SEQ ID NO: 378 и 379 и (h) SEQ ID NO: 388 и 389.

В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит (a) аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380 и 390 (см. таблицу E), или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; или (b) аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из 321, 331, 341, 351, 361, 371, 381, и 391 (см. таблицу E), или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; или (c) обе из (a) и (b). В некоторых вариантах осуществления белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержит такие вариabельные области.

В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит пару аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из (a) SEQ ID NOs: 320 и 321; (b) SEQ ID NOs: 330 и 331; (c) SEQ ID NOs: 340 и 341; (d) SEQ ID NOs: 350 и 351; (e) SEQ ID NOs: 360 и 361; (f) SEQ ID NOs: 370 и 371; (g) SEQ ID NOs: 380 и 381; и (h) SEQ ID NO: 390 и 391. В некоторых вариантах осуществления белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержит такие области.

В иллюстративных аспектах аминокислотные последовательности тяжелых цепей антитела к PD-1 (или его антигенсвязывающего фрагмента антитела) содержат совокупность мутаций с заменой пар заряженных аминокислот, описанных в данном документе. В конкретных аспектах аминокислотные последовательности тяжелых цепей антитела к PD-1 (или его антигенсвязывающего фрагмента антитела) содержат мутации с

заменой пар заряженных аминокислот, выбранные из мутаций с заменой пар заряженных аминокислот V1, V103 и V131.

В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат аминокислотную последовательность, сходную с указанной выше аминокислотной последовательностью, при этом антигенсвязывающий белок по сути сохраняет свою биологическую функцию, например, свою способность связываться с PD-1, например, PD-1 человека, PD-1 яванского макака, или уменьшать, блокировать, ингибировать, прекращать передачу сигнала, происходящую в результате взаимодействия PD-1 с одним или несколькими его партнерами по связыванию, такими как PD-L1 или PD-L2, или препятствовать ей.

В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат аминокислотную последовательность, которая отличается лишь 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше аминокислотами по сравнению с указанной(указанными) выше аминокислотной(аминокислотными) последовательностью(последовательностями). В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат последовательность, являющуюся вариантной по отношению к указанной последовательности, при этом данная вариантная последовательность отличается лишь одной или двумя аминокислотами по сравнению с указанной последовательностью. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок содержит одну или несколько аминокислотных замен, которые имеют место за пределами CDR, например, одна или несколько аминокислотных замен имеют место в пределах каркасной(каркасных) области(областей) тяжелой или легкой цепи. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат одну или несколько аминокислотных замен, при этом в антигенсвязывающем белке сохраняются аминокислотные последовательности шести CDR. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат аминокислотную последовательность, которая имеет лишь 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше консервативных аминокислотных замен по сравнению с указанной(указанными) выше аминокислотной(аминокислотными) последовательностью(последовательностями).

В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат аминокислотную последовательность, которая характеризуется превышающей или равняющейся приблизительно 30%, превышающей или равняющейся приблизительно 50% или превышающей или равняющейся приблизительно 70% идентичностью последовательности с указанной(указанными) выше аминокислотной(аминокислотными) последовательностью(последовательностями). В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по

меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или характеризуется более 90% идентичностью последовательности с указанной выше аминокислотной последовательностью. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или характеризуется более 90% идентичностью последовательности по всей длине указанной выше аминокислотной последовательности. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью последовательности по всей длине указанной выше аминокислотной последовательности.

В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат последовательность, являющуюся вариантной по отношению к указанной последовательности, при этом данная вариантная последовательность характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности по сравнению с указанной выше последовательностью. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат последовательность, являющуюся вариантной по отношению к указанной последовательности, при этом данная вариантная последовательность характеризуется по меньшей мере или приблизительно 80% идентичностью последовательности по сравнению с указанной выше последовательностью. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат последовательность, являющуюся вариантной по отношению к указанной последовательности, при этом данная вариантная последовательность характеризуется по меньшей мере или приблизительно 90% идентичностью последовательности по сравнению с указанной выше последовательностью. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат последовательность, являющуюся вариантной по отношению к указанной последовательности, при этом данная вариантная последовательность характеризуется по меньшей мере или приблизительно 95% идентичностью последовательности по сравнению с указанной выше последовательностью.

В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит одну, две, три, четыре или пять последовательностей под SEQ ID NO: в одном столбце таблицы D и по меньшей мере одну вариантную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере или приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%) идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 312-387. В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит одну, две, три, четыре или пять последовательностей из совокупности

последовательностей, выбранных из (a) SEQ ID NOs: 312-317; (b) SEQ ID NOs: 322-327; (c) SEQ ID NOs: 332-337; (d) SEQ ID NOs: 342-347; (e) SEQ ID NOs: 352-357; (f) SEQ ID NOs: 362-367; (g) SEQ ID NOs: 372-377; и (h) SEQ ID NOs: 382-387, где антитело или его фрагмент дополнительно содержат по меньшей мере одну вариантную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере или приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%) идентичностью последовательности с по меньшей мере одной из последовательностей в совокупности. Например, в иллюстративных аспектах антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит четыре последовательности под SEQ ID NO: 312-317, а именно, SEQ ID NO: 312-315, где антитело или его фрагмент содержат две вариантные последовательности: одну вариантную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере или приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 316, и другую вариантную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере или приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 317. В некоторых вариантах осуществления белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержит такие области.

В иллюстративных вариантах осуществления продукт на основе антитела к PD-1 (или его антигенсвязывающего фрагмента антитела) содержит пару вариантных последовательностей, характеризующихся по меньшей мере или приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%) идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 318, 319, 328, 329, 338, 339, 348, 349, 358, 359, 368, 369, 378, 379, 388, и 389. В иллюстративных примерах антитело или его фрагмент содержат пару вариантных последовательностей, которые характеризуются по меньшей мере или приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%) идентичностью последовательности с (a) SEQ ID NO: 318 и 319; (b) SEQ ID NO: 328 и 329; (c) SEQ ID NO: 338 и 339; (d) SEQ ID NO: 348 и 349; (e) SEQ ID NO: 358 и 359; (f) SEQ ID NO: 368 и 369; (g) SEQ ID NO: 378 и 379 и (h) SEQ ID NO: 388 и 389. В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит пару последовательностей: одну последовательность из таблицы Е и другую последовательность, которая представляет собой вариантную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере или приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%) идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 318, 319, 328, 329, 338, 339, 348, 349, 358, 359, 368, 369, 378, 379, 388, и 389. В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит пару последовательностей:



одну последовательность, выбранную из (a) SEQ ID NO: 318 и 319; (b) SEQ ID NO: 328 и 329; (c) SEQ ID NO: 338 и 339; (d) SEQ ID NO: 348 и 349; (e) SEQ ID NO: 358 и 359; (f) SEQ ID NO: 368 и 369; (g) SEQ ID NO: 378 и 379 и (h) SEQ ID NO: 388 и 389, и другую последовательность, которая представляет собой вариантную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере или приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%) идентичностью последовательности с последовательностью из (a) - (u). Например, в иллюстративных аспектах антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит последовательность под SEQ ID NO: 318 и дополнительно содержит вариантную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере или приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 319. В некоторых вариантах осуществления белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержит такие области.

В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит пару вариантных последовательностей, характеризующихся по меньшей мере или приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%) идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 320, 321, 330, 331, 340, 341, 350, 351, 360, 361, 370, 371, 380, 381, 390, и 391. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит пару вариантных последовательностей, которые характеризуются по меньшей мере или приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%) идентичностью последовательности с (a) SEQ ID NO: 320 и 321; (b) SEQ ID NO: 330 и 331; (c) SEQ ID NO: 340 и 341; (d) SEQ ID NO: 350 и 351; (e) SEQ ID NO: 360 и 361; (f) SEQ ID NO: 370 и 371; (g) SEQ ID NO: 380 и 381 и (h) SEQ ID NO: 390 и 391. В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит пару последовательностей: одну последовательность из таблицы E и другую последовательность, которая представляет собой вариантную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере или приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%) идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 320, 321, 330, 331, 340, 341, 350, 351, 360, 361, 370, 371, 380, 381, 390 и 391. В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит пару последовательностей: одну последовательность, выбранную из (a) SEQ ID NO: 320 и 321; (b) SEQ ID NO: 330 и 331; (c) SEQ ID NO: 340 и 341; (d) SEQ ID NO: 350 и 351; (e) SEQ ID NO: 360 и 361; (f) SEQ ID NO: 370 и 371; (g) SEQ ID NO: 380 и 381 и (h) SEQ ID NO: 390 и 391, и другую последовательность, которая представляет собой вариантную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере или

приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%) идентичностью последовательности с последовательностью из (а) - (и). Например, в иллюстративных аспектах антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит последовательность под SEQ ID NO: 320 и дополнительно содержит вариантную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере или приблизительно 70% (например, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 321. В некоторых вариантах осуществления белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержит такие области.

В дополнительных иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат одну или несколько аминокислотных модификаций по сравнению со встречающимся в природе аналогом для улучшения периода полувыведения/стабильности или для того, чтобы сделать антитело более подходящим для осуществления экспрессии/возможности изготовления (например, в виде слитого белка с мутеином IL-21). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 разработано с возможностью предотвращения или снижения взаимодействия между антителом к PD-1 и Fc-рецепторами. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 представляет собой стабильное антитело без эффекторных функций (SEFL), содержащее константную область, которая не обладает способностью к взаимодействию с Fcγ-рецепторами. Антитела SEFL известны из уровня техники. См., например, Liu et al., *J Biol Chem* 292: 1876-1883 (2016); и Jacobsen et al., *J. Biol. Chem.* 292: 1865-1875 (2017). В иллюстративных аспектах антитело SEFL содержит одну или несколько из следующих мутаций, нумерация которых указана в соответствии с системой EU: L242C, A287C, R292C, N297G, V302C, L306C и/или K334C. В иллюстративных аспектах антитело SEFL содержит N297G. В иллюстративных аспектах антитело SEFL содержит A287C, N297G и L306C. В других иллюстративных аспектах антитело SEFL содержит R292C, N297G и V302C (т. е. SEFL2-2).

Антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 могут содержать другие модификации для увеличения периода полувыведения (HLE). В иллюстративных примерах модификация HLE имеет место в константной области тяжелой цепи и включает одну или несколько из следующих мутаций, нумерация которых указана в соответствии с системой EU: M252Y, S254T и T256E. В иллюстративных примерах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат одну или две из M252Y, S254T и T256E. В иллюстративных примерах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат все три из M252Y, S254T и T256E. В иллюстративных аспектах константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 545, или SEQ ID NO: 547, или SEQ ID NO: 549 или аминокислотную последовательность,

которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 545, или SEQ ID NO: 547, или SEQ ID NO: 549. В иллюстративных примерах модификация HLE имеет место в константной области тяжелой цепи и включает одну или несколько из следующих мутаций, нумерация которых указана в соответствии с системой EU: L309D, Q311H и N434S. В иллюстративных примерах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат одну, две или три из L309D, Q311H и N434S. В иллюстративных примерах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат все три из L309D, Q311H и N434S. В иллюстративных аспектах константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 544, или SEQ ID NO: 546, или SEQ ID NO: 548 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 544, или SEQ ID NO: 546, или SEQ ID NO: 548.

В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат модификации SEFL2-2 и модификации HLE. В некоторых случаях модификации HLE включают одну, или две, или все три из M252Y, S254T и T256E. В иллюстративных аспектах константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 551, или SEQ ID NO: 553, или SEQ ID NO: 555 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 551, или SEQ ID NO: 553, или SEQ ID NO: 555. В некоторых случаях модификации HLE включают одну, или две, или все три из L309D, Q311H и N434S. В иллюстративных аспектах константная область тяжелой цепи

содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 550, или SEQ ID NO: 552, или SEQ ID NO: 554 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 550, или SEQ ID NO: 552, или SEQ ID NO: 554. В иллюстративных аспектах тяжелая цепь дополнительно содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот, описанные ниже.

В эукариотических клетках встречаются два типа реакций гликозилирования: (1) N-связанное гликозилирование, при котором гликаны присоединяются к аспарагину последовательности распознавания Asn-X-Thr/Ser, где "X" представляет собой любую аминокислоту, за исключением пролина, и (2) O-связанное гликозилирование, при котором гликаны присоединяются к серину или треонину. N-связанное гликозилирование начинается в эндоплазматическом ретикулуме (ER), где сложная совокупность реакций приводит в результате к присоединению сердцевинной структуры гликана, образованной главным образом из двух остатков GlcNAc и трех остатков Man. Гликановый комплекс, образующийся в ER, модифицируется под действием ферментов в аппарате Гольджи. Если сахарид является относительно недоступным для ферментов, он, как правило, остается в исходной НМ-форме. Если ферменты могут получать доступ к сахариду, то затем многие остатки Man отщепляются, и сахарид дополнительно модифицируется с образованием в результате N-гликановой структуры комплексного типа. Например, маннозидаза-1, локализованная в цис-отделе аппарата Гольджи, может расщеплять или гидролизировать НМ-гликан, тогда как фукозилтрансфераза FUT-8, локализованная в медиальном отделе аппарата Гольджи, фукозилирует гликан (Hanrue Imai-Nishiya (2007), BMC Biotechnology, 7:84). В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 является N-гликозилированным, например, содержит один или несколько сахарных фрагментов (например, гликанов, сахаридов), ковалентно присоединенных к специфической аминокислоте тяжелой цепи. В альтернативных аспектах антитело к PD-1 не является гликозилированным или не содержит каких-либо сахарных фрагментов (например, гликанов, сахаридов), ковалентно присоединенных к специфической аминокислоте тяжелой цепи.

В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 284 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%,

приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 284. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 284 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 284, и дополнительно содержит линкер. В иллюстративных примерах линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 262. Таким образом, в некоторых иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 287 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 287. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 284 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 284, с отсеченным или удаленным С-концевым Lys. В этом отношении в некоторых аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи, в которой отсутствует С-концевой Lys, и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 285 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например,

приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 285. Как правило, С-концевой лизин антитела подвергается отщеплению под действием карбоксипептидазы во время экспрессии. Константная область тяжелой цепи, в которой отсутствует С-концевой Lys, преимущественно предотвращает воздействие карбоксипептидазы на тяжелую цепь антитела к PD-1. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи, в которой отсутствует С-концевой Lys, и дополнительно содержит линкер. В иллюстративных примерах линкер содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 262. Таким образом, в некоторых иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 286 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 286. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 284 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 284, и имеющую одну или несколько мутаций SEFL, которые предотвращают или снижают взаимодействие между антителом к PD-1 и Fc-рецепторами, в том числе без ограничения L242C, A287C, R292C, N297G, V302C, L306C и/или K334C. В иллюстративных аспектах мутации SEFL представляют собой мутации SEFL2-2: R292C, N297G и V302C, так что антитело к PD-1 содержит аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 265 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%,

приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 265. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи с мутациями SEFL2-2 и отсеченным или удаленным С-концевым Lys. Такая константная область тяжелой цепи может содержать последовательность под SEQ ID NO: 266. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи с мутациями SEFL2-2 и отсеченным или удаленным С-концевым Lys и линкер. Такая константная область тяжелой цепи может содержать последовательность под SEQ ID NO: 267. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи с мутациями SEFL2-2 без отсечения С-концевого Lys и линкер. Такая константная область тяжелой цепи может содержать последовательность под SEQ ID NO: 282.

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 присоединен к Fc антитела к PD-1. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 присоединен к одной из двух тяжелых цепей антитела. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 присоединен к С-концу одной из двух тяжелых цепей антитела.

В иллюстративных аспектах слитый белок содержит только один мутеин IL-21 (т. е. слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21). В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 присоединен к С-концу одной из двух тяжелых цепей антитела. В иллюстративных аспектах, если слитый белок содержит только один мутеин IL-21, Fc антитела содержит модификации, разработанные для управления гетеродимеризацией двух тяжелых цепей (одной тяжелой цепи, слитой с мутеином IL-21, и одной тяжелой цепи без мутеина IL-21). Такие модификации включают мутации Fc, такие как "выступы во впадины", DuoBody, Azymetric, замены пар заряженных аминокислот, HA-TF, SEEDbody и модификации с дифференциальной аффинностью к белку А. См., например, Spiess et al., *Molecular Immunology*, 67(2, Part A), 2015, pp. 95-106. Мутации по типу "выступы во впадины" включают T366W в первой тяжелой цепи и T366S, L368A и/или Y407V во второй тяжелой цепи. См., например, Ridgway et al., *Protein Eng.*, 9 (1996), pp. 617-621; и Atwell et al., *J. Mol. Biol.*, 270 (1997), pp. 26-35. Мутации DuoBody включают F405L в первой тяжелой цепи и K409R во второй тяжелой цепи. См., например, Labrijn et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110 (2013), pp. 5145-5150. Мутации Azymetric включают T350V, L351Y, F405A и/или Y407V в первой тяжелой цепи и T350V, T366L, K392L и/или T394W во второй тяжелой цепи. См., например, Von Kreudenstein et al., *mAbs*, 5 (2013), pp. 646-654. Мутации HA-TF включают S364N и/или F405A в первой тяжелой цепи и Y349T и/или T394F во второй тяжелой цепи. См., например, Moore et al., *mAbs*, 3 (2011), pp. 546-557. Мутации SEEDbody включают мутации химеризации IgG/A в первой тяжелой цепи и мутации химеризации IgG/A во второй тяжелой цепи. См., например, Davis et al., *Protein Eng. Des. Sel.*, 23 (2010), pp. 195-202. Мутации с дифференциальной аффинностью к белку А включают H435R в одной тяжелой цепи и отсутствие мутаций в другой тяжелой цепи. См., например, патент США № 8586713.

В конкретном примере мутации представляют собой мутации с заменой пар

заряженных аминокислот. Далее приведены примеры таких мутаций с заменой пар заряженных аминокислот, нумерация которых указана в соответствии с системой EU. Мутации с заменой пар заряженных аминокислот включают K409D в первой тяжелой цепи и D399K во второй тяжелой цепи; K392D в первой тяжелой цепи и E356K во второй тяжелой цепи; или обе из K409D и K392D в первой тяжелой цепи и обе из D399K и E356K во второй тяжелой цепи (последнее обозначено как "V1" в данном документе). См., например, Gunasekaran et al., *J Biol Chem* 285: 19637-19646 (2010). В другом конкретном примере мутации с заменой пар заряженных аминокислот включают K439D, K392D и K409D в первой тяжелой цепи; а также E356K и D399K во второй тяжелой цепи (что обозначено как "V103" в данном документе). В еще одном конкретном примере мутации с заменой пар заряженных аминокислот включают K360E, K370E, K392E и K409D в первой тяжелой цепи; а также E357K и D399K во второй тяжелой цепи (что обозначено как "V131" в данном документе). Мутации с заменой пар заряженных аминокислот также могут включать K370D в первой тяжелой цепи и E357K во второй тяжелой цепи; или все три из K409D, K392D и K370D в первой тяжелой цепи и все три из D399K, E357K и E356K во второй тяжелой цепи (последнее обозначено как "V4" в данном документе). Дополнительные мутации с заменой пар заряженных аминокислот также включают D221E, P228E и/или L368E в первой тяжелой цепи и D221R, P228R и/или K409R во второй тяжелой цепи. См., например, Strop et al., *J. Mol. Biol.*, 420 (2012), pp. 204-219.

В вариантах осуществления, где слитый белок содержит только один мутеин IL-21 (т. е. слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21), а тяжелая цепь содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1, мутеин IL-21 может быть присоединен к тяжелой цепи, содержащей мутации K409D и K392D (например, мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 294, 296 или 298), или тяжелой цепи, содержащей мутации D399K и E356K (например, мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 295, 297 или 299). В конкретном варианте осуществления мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей мутации D399K и E356K.

В вариантах осуществления, где слитый белок содержит только один мутеин IL-21 (т. е. слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21), а тяжелая цепь содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V4, мутеин IL-21 может быть присоединен к тяжелой цепи, содержащей мутации K409D, K392D и K370D (например, мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 288, 290 или 292), или тяжелой цепи, содержащей мутации D399K, E357K и E356K (например, мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 289, 291 или 293). В конкретном варианте осуществления мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей мутации D399K, E357K и E356K.

В вариантах осуществления, где слитый белок содержит только один мутеин IL-21 (т. е. слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21), а тяжелая цепь содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103, мутеин IL-21 может быть присоединен к тяжелой цепи, содержащей мутации K439D, K392D и K409D (например, мутеин IL-21



присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 472, 474 или 476), или тяжелой цепи, содержащей мутации E356K и D399K (например, мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 473, 475 или 477). В конкретном варианте осуществления мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей мутации E356K и D399K.

В вариантах осуществления, где слитый белок содержит только один мутеин IL-21 (т. е. слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21), а тяжелая цепь содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V131, мутеин IL-21 может быть присоединен к тяжелой цепи, содержащей мутации K360E, K370E, K392E и K409D (например, мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 478, 480 или 482), или тяжелой цепи, содержащей мутации E357K и D399K (например, мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 479, 481 или 483). В конкретном варианте осуществления мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей мутации E357K и D399K.

Таким образом, в иллюстративных аспектах антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит совокупность мутаций с заменой пар заряженных аминокислот, описанных в данном документе. В конкретных аспектах антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот, выбранные из мутаций с заменой пар заряженных аминокислот V1, V103 и V131.

В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 284 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 284, с одной или несколькими мутациями с заменой пар заряженных аминокислот, например, мутациями с заменой пар заряженных аминокислот V1, V4, V103 или V131. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 284 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 284, с мутациями с заменой пар заряженных

аминокислот V1, где константная область первой тяжелой цепи содержит мутации K409 и K392D, и константная область второй тяжелой цепи содержит мутации D399K и E356K. Такая константная область первой тяжелой цепи может содержать последовательность под SEQ ID NO: 294, и такая константная область второй тяжелой цепи может содержать последовательность под SEQ ID NO: 295. Такие константные области первой и второй тяжелой цепей могут иметь отсеченный или удаленный С-концевой Lys, так что константные области первой и второй тяжелой цепей могут содержать SEQ ID NO: 296 и 297 соответственно. Такие константные области первой и второй тяжелой цепей могут иметь отсеченный или удаленный С-концевой Lys и линкер, так что константные области первой и второй тяжелой цепей могут содержать SEQ ID NO: 298 и 299 соответственно. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 и мутации SEFL2-2. Такая константная область первой тяжелой цепи, содержащая мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 и мутации SEFL2-2, может содержать последовательность под SEQ ID NO: 306, и такая константная область второй тяжелой цепи, содержащая мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 и мутации SEFL2-2, может содержать последовательность под SEQ ID NO: 307. Рассматриваются дополнительные варианты таких первой и второй тяжелых цепей, в том числе, например, тяжелые цепи с отсеченным или удаленным С-концевым Lys (SEQ ID NO: 308 и 309) и с отсеченным или удаленным С-концевым Lys и с линкером (SEQ ID NO: 310 и 311).

В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 284 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 284, с мутациями с заменой пар заряженных аминокислот V4, где константная область первой тяжелой цепи содержит мутации K409, K392D и K370D, и константная область второй тяжелой цепи содержит мутации D399K, E356K и E357K. Такая константная область первой тяжелой цепи может содержать последовательность под SEQ ID NO: 288, и такая константная область второй тяжелой цепи может содержать последовательность под SEQ ID NO: 289. Такие константные области первой и второй тяжелой цепей могут иметь отсеченный или удаленный С-концевой Lys, так что константные области первой и второй тяжелой цепей могут содержать SEQ ID NO: 290 и 291 соответственно. Такие константные области первой и второй тяжелой цепей могут иметь отсеченный или удаленный С-концевой Lys и линкер, так что константные области первой и второй тяжелой цепей могут содержать SEQ ID NO: 292 и 293

соответственно. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации с заменой пар заряженных аминокислот V4 и мутации SEFL2-2. Такая константная область первой тяжелой цепи, содержащая мутации с заменой пар заряженных аминокислот V4 и мутации SEFL2-2, может содержать последовательность под SEQ ID NO: 300, и такая константная область второй тяжелой цепи, содержащая мутации с заменой пар заряженных аминокислот V4 и мутации SEFL2-2, может содержать последовательность под SEQ ID NO: 301. Рассматриваются дополнительные варианты таких первой и второй тяжелых цепей, в том числе, например, тяжелые цепи с отсеченным С-концевым Lys (SEQ ID NO: 302 и 303) и с отсеченным или удаленным С-концевым Lys и с линкером (SEQ ID NO: 304 и 305).

В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 284 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 284, с мутациями с заменой пар заряженных аминокислот V103, где константная область первой тяжелой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 484, и константная область второй тяжелой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 485. Такие константные области первой и второй тяжелой цепей могут иметь отсеченный или удаленный С-концевой Lys, так что константные области первой и второй тяжелой цепей могут содержать SEQ ID NO: 486 и 487 соответственно. Такие константные области первой и второй тяжелой цепей могут иметь отсеченный или удаленный С-концевой Lys и линкер, так что константные области первой и второй тяжелой цепей могут содержать SEQ ID NO: 488 и 489 соответственно. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103 и мутации SEFL2-2. Такая константная область первой тяжелой цепи, содержащая мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103 и мутации SEFL2-2, может содержать последовательность под SEQ ID NO: 484, и такая константная область второй тяжелой цепи, содержащая мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103 и мутации SEFL2-2, может содержать последовательность под SEQ ID NO: 485. Рассматриваются дополнительные варианты таких первой и второй тяжелых цепей, в том числе, например, тяжелые цепи с отсеченным С-концевым Lys (SEQ ID NO: 486 и 487) и с отсеченным или удаленным С-концевым Lys и с линкером (SEQ ID NO: 488 и 489).

В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 284 или

аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 284, с мутациями с заменой пар заряженных аминокислот V131, где константная область первой тяжелой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 478, и константная область второй тяжелой цепи содержит последовательность под SEQ ID NO: 479. Такие константные области первой и второй тяжелой цепей могут иметь отсеченный или удаленный С-концевой Lys, так что константные области первой и второй тяжелой цепей могут содержать SEQ ID NO: 480 и 481 соответственно. Такие константные области первой и второй тяжелой цепей могут иметь отсеченный или удаленный С-концевой Lys и линкер, так что константные области первой и второй тяжелой цепей могут содержать SEQ ID NO: 482 и 483 соответственно. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область тяжелой цепи, содержащую мутации с заменой пар заряженных аминокислот V131 и мутации SEFL2-2. Такая константная область первой тяжелой цепи, содержащая мутации с заменой пар заряженных аминокислот V131 и мутации SEFL2-2, может содержать последовательность под SEQ ID NO: 490, и такая константная область второй тяжелой цепи, содержащая мутации с заменой пар заряженных аминокислот V131 и мутации SEFL2-2, может содержать последовательность под SEQ ID NO: 491. Рассматриваются дополнительные варианты таких первой и второй тяжелых цепей, в том числе, например, тяжелые цепи с отсеченным С-концевым Lys (SEQ ID NO: 492 и 493) и с отсеченным или удаленным С-концевым Lys и с линкером (SEQ ID NO: 494 и 495).

В альтернативных аспектах слитый белок содержит более одного мутеина IL-21 (т. е. слитый белок содержит димерный мутеин IL-21 или мультимерный мутеин IL-21). В иллюстративных альтернативных аспектах слитый белок содержит 2, 3 или 4 (или больше) мутеина IL-21. В иллюстративных аспектах, если слитый белок содержит более одного мутеина IL-21, каждый мутеин IL-21 имеет одну и ту же структуру, например, одну и ту же аминокислотную последовательность. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимерный IL-21 или гомомультимерный IL-21. В альтернативных аспектах каждый мутеин IL-21 слитого белка имеет отличающуюся структуру, например, отличающуюся аминокислотную последовательность. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гетеродимерный IL-21 или гетеромультимерный IL-21. В иллюстративных примерах слитый белок содержит два мутеина IL-21, где первый мутеин IL-21 связан с С-концом первой тяжелой цепи антитела, и второй мутеин IL-21 связан с С-концом второй тяжелой цепи антитела. В иллюстративных аспектах каждый мутеин IL-21 имеет одну и ту же аминокислотную последовательность (например, они образуют

гомодимерный мутеин IL-21). В иллюстративных аспектах первый мутеин IL-21 имеет отличающуюся аминокислотную последовательность по сравнению со вторым мутеином IL-21 (например, они образуют гетеродимерный мутеин IL-21).

Что касается слитых белков, содержащих один или несколько мутеинов IL-21, каждый мутеин IL-21 может быть присоединен к одной из тяжелых цепей антитела с помощью линкера или без него. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 присоединен к С-концу одной из тяжелых цепей антитела посредством линкера, и линкер представляет собой пептид. В иллюстративных примерах пептид содержит аминокислотную последовательность GGGGS (SEQ ID NO: 262). В альтернативных аспектах мутеин IL-21 непосредственно присоединен к С-концу одной из тяжелых цепей антитела без линкера.

В иллюстративных аспектах слитый белок содержит только один мутеин IL-21, который непосредственно присоединен к С-концу одной из тяжелых цепей антитела к PD-1. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную замену, указанную в таблице 4, или последовательность под SEQ ID NO:, указанным в таблице 4. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную замену, указанную в таблице 5, или последовательность под SEQ ID NO:, указанным в таблице 5. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены, указанные в таблице 7, или последовательность под SEQ ID NO:, указанным в таблице 7. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены, указанные в любой из таблиц 6 и 8-14, или последовательность под SEQ ID NO:, указанным в этих таблицах. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 159, 161, 238, 241, 242 или 244. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 непосредственно присоединен к антителу к PD-1 и не содержит пептидного линкера.

В иллюстративных аспектах слитый белок содержит два мутеина IL-21, каждый из которых непосредственно присоединен к С-концу тяжелой цепи антитела к PD-1 и каждый из которых имеет одну и ту же аминокислотную последовательность. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную замену, указанную в таблице 4, или последовательность под SEQ ID NO:, указанным в таблице 4. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную замену, указанную в таблице 5, или последовательность под SEQ ID NO:, указанным в таблице 5. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены, указанные в таблице 7, или последовательность под SEQ ID NO:, указанным в таблице 7. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены, указанные в любой из таблиц 6 и 8-14, или последовательность под SEQ ID NO:, указанным в этих таблицах. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 159, 161, 237, 238, 241 и 244. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 непосредственно присоединен к антителу к PD-1 и не содержит пептидного линкера.

В иллюстративных аспектах слитый белок содержит аминокислотную последовательность константной области антитела, описанной в данном документе, слитую

с аминокислотной последовательностью любого мутеина IL-21, описанного в данном документе. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит аминокислотную последовательность константной области антитела, описанной в данном документе, которая не является гликозилированной, слитую с аминокислотной последовательностью любого мутеина IL-21, описанного в данном документе. В иллюстративных примерах слитый белок содержит константную область, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 265-267, 282, 284-311, 472-495, и 544-555 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 265-267, 282, 284-311, 472-495, и 544-555, слитую с мутеином IL-21, содержащим любую из SEQ ID NO: 3-21, 23-56, 58-112, 114-208, 210-222, 224-255, и 283 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3-21, 23-56, 58-112, 114-208, 210-222, 224-255, и 283. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 268-281 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 268-281.

В иллюстративных вариантах осуществления слитый белок содержит конструкцию, описанную на фигурах 4А, 4В или 4С. В иллюстративных вариантах осуществления слитый белок содержит (i) антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела), описанное в данном документе; и (ii) мутеин IL-21, описанный в данном документе. В дополнительных иллюстративных вариантах осуществления слитый белок содержит (i) антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела), описанное в данном документе; (ii) мутацию с заменой пар заряженных аминокислот, описанную в данном

документе; и (iii) мутеин IL-21, описанный в данном документе (см., например, фигуру 4C). В других иллюстративных вариантах осуществления слитый белок содержит (i) антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела), описанное в данном документе, где последовательности тяжелой цепи указанного антитела к PD-1 (или его антигенсвязывающего фрагмента антитела) не содержат С-концевой лизин; (ii) мутацию с заменой пар заряженных аминокислот, описанную в данном документе; и (iii) мутеин IL-21, описанный в данном документе.

В иллюстративных примерах антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит (a) аминокислотную последовательность области 1, определяющей комплементарность (CDR), тяжелой цепи (HC), приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372 и 382, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373 и 383, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (c) аминокислотную последовательность CDR3 HC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, и 384, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (d) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC), приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375, и 385, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (e) аминокислотную последовательность CDR2 LC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376, и 386, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (f) аминокислотную последовательность CDR3 LC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, и 387, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; или (g) комбинацию любых двух или более из (a)-(f). В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 (или его

антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит аминокислотную последовательность CDR1 LC, аминокислотную последовательность CDR2 LC и аминокислотную последовательность CDR3 LC, приведенные в таблице D, и по меньшей мере 1 или 2 из аминокислотных последовательностей CDR HC, приведенных в таблице D. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит 3, 4, 5 или 6 аминокислотных последовательностей, представленных под SEQ ID NO: в одном столбце таблицы D. В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат шесть аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из (a) SEQ ID NOs: 312-317; (b) SEQ ID NOs: 322-327; (c) SEQ ID NOs: 332-337; (d) SEQ ID NOs: 342-347; (e) SEQ ID NOs: 352-357; (f) SEQ ID NOs: 362-367; (g) SEQ ID NOs: 372-377; и (h) SEQ ID NOs: 382-387. В некоторых вариантах осуществления белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержит такие области.

В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит (a) аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, приведенную в таблице E, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из 318, 328, 338, 348, 358, 368, 378, и 388, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; или (b) аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, приведенную в таблице E, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из 319, 329, 339, 349, 359, 369, 379, и 389, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; или (c) обе из (a) и (b). В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1 (или его антигенсвязывающий фрагмент антитела) содержит пару аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO: 318 и 319; (b) SEQ ID NO: 328 и 329; (c) SEQ ID NO: 338 и 339; (d) SEQ ID NO: 348 и 349; (e) SEQ ID NO: 358 и 359; (f) SEQ ID NO: 368 и 369; (g) SEQ ID NO: 378 и 379 и (h) SEQ ID NO: 388 и 389. В иллюстративных примерах константная область антитела содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 265-267, 282 и 284-311 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 265-267, 282, и 284-311, слитую с мутеином IL-21, содержащим любую из SEQ ID NO: 3-21, 23-56, 58-112, 114-208, 210-222,



224-255, и 283 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3-21, 23-56, 58-112, 114-208, 210-222, 224-255, и 283. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит пару аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO: 320 и 321; (b) SEQ ID NO: 330 и 331; (c) SEQ ID NO: 340 и 341; (d) SEQ ID NO: 350 и 351; (e) SEQ ID NO: 360 и 361; (f) SEQ ID NO: 370 и 371; (g) SEQ ID NO: 380 и 381 и (h) SEQ ID NO: 390 и 391. В иллюстративных вариантах осуществления слитый белок содержит (I) пару аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO: 320 и 321; (b) SEQ ID NO: 330 и 331; (c) SEQ ID NO: 340 и 341; (d) SEQ ID NO: 350 и 351; (e) SEQ ID NO: 360 и 361; (f) SEQ ID NO: 370 и 371; (g) SEQ ID NO: 380 и 381 и (h) SEQ ID NO: 390 и 391, и (II) мутеин IL-21, содержащий любую из SEQ ID NO: 3-21, 23-56, 58-112, 114-208, 210-222, 224-255 и 283 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3-21, 23-56, 58-112, 114-208, 210-222, 224-255, и 283.

В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, показанный на фигуре 4A, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 355-357), три CDR тяжелой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 352-354), и каждая тяжелая цепь содержит последовательность константной области, содержащую мутации SEFL2-2 (например, SEQ ID NO: 265 или 266), где каждый из двух мутеинов IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76A (т. е. каждый содержит последовательность под SEQ ID NO: 244). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 358 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 359. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 360 или легкую цепь под SEQ ID NO: 361. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 361 и 562 или SEQ ID NO: 361 и 563. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 361) и две тяжелые цепи антитела

(каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 562). В иллюстративных аспектах слитый белок содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 361) и две тяжелые цепи антитела (каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 563).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, показанный на фигуре 4A, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 355-357), три CDR тяжелой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 352-354), и каждая тяжелая цепь содержит последовательность константной области, содержащую мутации SEFL2-2 (например, SEQ ID NO: 265 или 266), где каждый из двух мутеинов IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76E (т. е. каждый содержит последовательность под SEQ ID NO: 245). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 358 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 359. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 360 или легкую цепь под SEQ ID NO: 361. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 361 и 564 или SEQ ID NO: 361 и 565. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 361) и две тяжелые цепи антитела (каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 564). В иллюстративных аспектах слитый белок содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 361) и две тяжелые цепи антитела (каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 565).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, показанный на фигуре 4B, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 355-357), три CDR тяжелой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 352-354), и каждая тяжелая цепь содержит последовательность константной области, содержащую мутации SEFL2-2, и линкер (например, SEQ ID NO: 267), где каждый из двух мутеинов IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76A (т. е. каждый содержит последовательность под SEQ ID NO: 244). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 358 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 359. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 360 или легкую цепь под SEQ ID NO: 361. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 361 и 566. В иллюстративных аспектах слитый белок

содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 361) и две тяжелые цепи антитела (каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 566).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, показанный на фигуре 4B, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 355-357), три CDR тяжелой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 352-354), и каждая тяжелая цепь содержит последовательность константной области, содержащую мутации SEFL2-2, и линкер (например, SEQ ID NO: 267), где каждый из двух мутеинов IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76E (т. е. каждый содержит последовательность под SEQ ID NO: 245). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 358 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 359. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 360 или легкую цепь под SEQ ID NO: 361. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 361 и 567. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 361) и две тяжелые цепи антитела (каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 567).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4C, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 355-357), три CDR тяжелой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 352-354) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 (например, SEQ ID NO: 306 и 307 или SEQ ID NO: 308 и 309), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 E356K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей любую из SEQ ID NO: 309), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76A (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 244). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 358 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 359. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 360 или легкую цепь под SEQ ID NO: 361. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 361 и 568. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 361) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 568, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 574).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4С, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 355-357), три CDR тяжелой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 352-354) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103 (например, SEQ ID NO: 484 и 485 или SEQ ID NO: 486 и 487), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103 E356K и D399K (например, т. е. мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 487), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76A (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 244). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит вариабельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 358 и вариабельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 359. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 360 или легкую цепь под SEQ ID NO: 361. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 361 и 569. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 361) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 569, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 575).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4С, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 355-357), три CDR тяжелой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 352-354) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V131 (например, SEQ ID NO: 490 и 491 или SEQ ID NO: 492 и 493), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V131 E357K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 493), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76A (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 244). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит вариабельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 358 и вариабельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 359. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 360 или легкую цепь под SEQ ID NO: 361. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 361 и 570. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 361) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21

и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 570, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 576).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4C, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 355-357), три CDR тяжелой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 352-354) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 (например, SEQ ID NO: 306 и 307 или SEQ ID NO: 308 и 309), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 E356K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 309), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76E (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 245). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 358 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 359. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 360 или легкую цепь под SEQ ID NO: 361. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 361 и 571. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 361) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 571, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 574).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4C, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 355-357), три CDR тяжелой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 352-354) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103 (например, SEQ ID NO: 484 и 485 или SEQ ID NO: 486 и 487), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103 E356K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 487), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76E (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 245). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 358 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 359. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 360 или легкую цепь под SEQ ID NO: 361. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 361 и 572. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи

антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 361) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 572, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 575).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4C, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 355-357), три CDR тяжелой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 352-354) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V131 (например, SEQ ID NO: 490 и 491 или SEQ ID NO: 492 и 493), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 E357K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 493), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76E (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 245). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 358 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 359. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 360 или легкую цепь под SEQ ID NO: 361. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 361 и 573. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 573, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 576).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, показанный на фигуре 4A, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 385-387), три CDR тяжелой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 382-384), и каждая тяжелая цепь содержит последовательность константной области, содержащую мутации SEFL2-2 (например, SEQ ID NO: 265 или 266), где каждый из двух мутеинов IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76A (т. е. каждый содержит последовательность под SEQ ID NO: 244). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 388 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 389. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 390 или легкую цепь под SEQ ID NO: 391. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 389 и 496 или SEQ ID NO: 389 и 519. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 391) и две тяжелые цепи антитела

(каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 496). В иллюстративных аспектах слитый белок содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 391) и две тяжелые цепи антитела (каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 519).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, показанный на фигуре 4A, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 385-387), три CDR тяжелой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 382-384), и каждая тяжелая цепь содержит последовательность константной области, содержащую мутации SEFL2-2 (например, SEQ ID NO: 265 или 266), где каждый из двух мутеинов IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76E (т. е. каждый содержит последовательность под SEQ ID NO: 245). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 388 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 389. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 390 или легкую цепь под SEQ ID NO: 391. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 389 и 497 или SEQ ID NO: 389 и 498. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 391) и две тяжелые цепи антитела (каждая из которых слита с мутеином IL-21, и продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 497). В иллюстративных аспектах слитый белок содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 391) и две тяжелые цепи антитела (каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 498).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, показанный на фигуре 4B, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 385-387), три CDR тяжелой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 382-384), и каждая тяжелая цепь содержит последовательность константной области, содержащую мутации SEFL2-2, и линкер (например, SEQ ID NO: 267), где каждый из двух мутеинов IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76A (т. е. каждый содержит последовательность под SEQ ID NO: 244). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 388 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 389. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 390 или легкую цепь под SEQ ID NO: 391. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 389 и 499. В иллюстративных аспектах слитый белок

содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 391) и две тяжелые цепи антитела (каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 499).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, показанный на фигуре 4B, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 385-387), три CDR тяжелой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 382-384), и каждая тяжелая цепь содержит последовательность константной области, содержащую мутации SEFL2-2, и линкер (например, SEQ ID NO: 267), где каждый из двух мутеинов IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76E (т. е. каждый содержит последовательность под SEQ ID NO: 245). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 388 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 389. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 390 или легкую цепь под SEQ ID NO: 391. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 389 и 500. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 391) и две тяжелые цепи антитела (каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 500).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4C, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 385-387), три CDR тяжелой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 382-384) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 (например, SEQ ID NO: 306 и 307 или SEQ ID NO: 308 и 309), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 E356K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 309), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76A (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 244). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 388 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 389. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 390 или легкую цепь под SEQ ID NO: 391. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 389 и 501. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 391) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 501, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID



NO: 556).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4С, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 385-387), три CDR тяжелой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 382-384) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103 (например, SEQ ID NO: 484 и 485 или SEQ ID NO: 486 и 487), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103 E356K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 487), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76A (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 244). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 388 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 389. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 390 или легкую цепь под SEQ ID NO: 391. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 389 и 502. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 391) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 502, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 557).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4С, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 385-387), три CDR тяжелой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 382-384) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V131 (например, SEQ ID NO: 490 и 491 или SEQ ID NO: 492 и 493), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V131 E357K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 493), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76A (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 244). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 388 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 389. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 390 или легкую цепь под SEQ ID NO: 391. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 389 и 503. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 391) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21

и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 503, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 558).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4С, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 385-387), три CDR тяжелой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 382-384) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 (например, SEQ ID NO: 306 и 307 или SEQ ID NO: 308 и 309), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 E356K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 309), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76E (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 245). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 388 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 389. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 390 или легкую цепь под SEQ ID NO: 391. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 389 и 504. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 391) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 504, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 556).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4С, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 385-387), три CDR тяжелой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 382-384) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103 (например, SEQ ID NO: 484 и 485 или SEQ ID NO: 486 и 487), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103 E356K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 487), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76E (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 245). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 388 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 389. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 390 или легкую цепь под SEQ ID NO: 391. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 389 и 505. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи

антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 391) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 505, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 557).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4C, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 385-387), три CDR тяжелой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 382-384) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V131 (например, SEQ ID NO: 490 и 491 или SEQ ID NO: 492 и 493), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V131 E357K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей любую из SEQ ID NO: 493), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76E (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 245). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 388 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 389. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 390 или легкую цепь под SEQ ID NO: 391. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 389 и 506. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 391) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 506, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 558).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, показанный на фигуре 4A, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 365-367), три CDR тяжелой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 362-364), и каждая тяжелая цепь содержит последовательность константной области, содержащую мутации SEFL2-2 (например, SEQ ID NO: 265 или 266), где каждый из двух мутеинов IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76A (т. е. каждый содержит последовательность под SEQ ID NO: 244). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 368 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 369. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 370 или легкую цепь под SEQ ID NO: 371. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 369 и 507 или SEQ ID NO: 369 и 508. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две тяжелые цепи антитела

(каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 507). В иллюстративных аспектах слитый белок содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две тяжелые цепи антитела (каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 508).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, показанный на фигуре 4A, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 365-367), три CDR тяжелой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 362-364), и каждая тяжелая цепь содержит последовательность константной области, содержащую мутации SEFL2-2 (например, SEQ ID NO: 265 или 266), где каждый из двух мутеинов IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76E (т. е. каждый содержит последовательность под SEQ ID NO: 245). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 368 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 369. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 370 или легкую цепь под SEQ ID NO: 371. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 369 и 509 или SEQ ID NO: 369 и 510. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две тяжелые цепи антитела (каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 509). В иллюстративных аспектах слитый белок содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две тяжелые цепи антитела (каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 510).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, показанный на фигуре 4B, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 365-367), три CDR тяжелой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 362-364), и каждая тяжелая цепь содержит последовательность константной области, содержащую мутации SEFL2-2, и линкер (например, SEQ ID NO: 267), где каждый из двух мутеинов IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76A (т. е. каждый содержит последовательность под SEQ ID NO: 244). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 368 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 369. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 370 или легкую цепь под SEQ ID NO: 371. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 369 и 511. В иллюстративных аспектах слитый белок

содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две тяжелые цепи антитела (каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 511).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, показанный на фигуре 4B, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 365-367), три CDR тяжелой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 362-364), и каждая тяжелая цепь содержит последовательность константной области, содержащую мутации SEFL2-2, и линкер (например, SEQ ID NO: 267), где каждый из двух мутеинов IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76E (т. е. каждый содержит последовательность под SEQ ID NO: 245). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 368 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 369. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 370 или легкую цепь под SEQ ID NO: 371. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 369 и 512. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит гомодимер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две тяжелые цепи антитела (каждая из которых слита с мутеином IL-21, и каждый продукт слияния тяжелая цепь-мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 512).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4C, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 365-367), три CDR тяжелой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 362-364) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 (например, SEQ ID NO: 306 и 307 или SEQ ID NO: 308 и 309), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 E356K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей любую из SEQ ID NO: 309), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76A (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 244). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 368 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 369. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 370 или легкую цепь под SEQ ID NO: 371. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 369 и 513. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 513, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 559).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4С, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 365-367), три CDR тяжелой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 362-364) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103 (например, SEQ ID NO: 484 и 485 или SEQ ID NO: 486 и 487), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103 E356K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 487), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76A (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 244). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 368 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 369. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 370 или легкую цепь под SEQ ID NO: 371. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 369 и 514. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 514, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 560).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4С, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 365-367), три CDR тяжелой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 362-364) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V131 (например, SEQ ID NO: 490 и 491 или SEQ ID NO: 492 и 493), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V131 E357K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 493), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76A (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 244). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 368 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 369. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 370 или легкую цепь под SEQ ID NO: 371. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 369 и 515. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21

и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 515, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 561).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4С, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 365-367), три CDR тяжелой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 362-364) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 (например, SEQ ID NO: 306 и 307 или SEQ ID NO: 308 и 309), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 E356K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 309), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76E (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 245). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит вариабельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 368 и вариабельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 369. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 370 или легкую цепь под SEQ ID NO: 371. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 369 и 516. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 516, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 559).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4С, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 365-367), три CDR тяжелой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 362-364) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103 (например, SEQ ID NO: 484 и 485 или SEQ ID NO: 486 и 487), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V103 E356K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 487), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76E (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 245). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит вариабельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 368 и вариабельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 369. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 370 или легкую цепь под SEQ ID NO: 371. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 369 и 517. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи

антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 517, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 560).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4C, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 365-367), три CDR тяжелой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 362-364) и пару тяжелых цепей, содержащих последовательности константных областей, содержащие мутации SEFL2-2 и мутации с заменой пар заряженных аминокислот V131 (например, SEQ ID NO: 490 и 491 или SEQ ID NO: 492 и 493), где мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, которая содержит мутации с заменой пар заряженных аминокислот V1 E357K и D399K (например, мономерный мутеин IL-21 присоединен к тяжелой цепи, содержащей SEQ ID NO: 493), и где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены R9E и R76E (т. е. содержит последовательность под SEQ ID NO: 245). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит переменную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 368 и переменную область легкой цепи под SEQ ID NO: 369. В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит тяжелую цепь под SEQ ID NO: 370 или легкую цепь под SEQ ID NO: 371. В иллюстративных примерах слитый белок содержит мономер, содержащий аминокислотные последовательности под SEQ ID NO: 369 и 518. В иллюстративных аспектах слитый белок содержит мономер, содержащий две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 518, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 561).

В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4A или 4B, или мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4C, и антитело к PD-1, содержащее три CDR легкой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 365-367), три CDR тяжелой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 362-364) и последовательность константной области тяжелой цепи, включающую в себя любую из SEQ ID NO: 544-555. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4A или 4B, или мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4C, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 365-367), три CDR тяжелой цепи антитела 20A2.003 (SEQ ID NO: 362-364) и последовательность константной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 525 или 527.

В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4A или 4B, или мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4C, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 385-387), три CDR тяжелой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 382-384) и



последовательность константной области тяжелой цепи, включающую в себя любую из SEQ ID NO: 544-555. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4А или 4В, или мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 385-387), три CDR тяжелой цепи антитела 22D4.017 (SEQ ID NO: 382-384) и последовательность константной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 529 или 531.

В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4А или 4В, или мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4С, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 355-357), три CDR тяжелой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 352-354) и последовательность константной области тяжелой цепи, включающую в себя любую из SEQ ID NO: 544-555. В иллюстративных примерах слитый белок содержит гомодимерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4А или 4В, или мономерный мутеин IL-21, показанный на фигуре 4С, где антитело к PD-1 содержит три CDR легкой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 355-357), три CDR тяжелой цепи антитела 20C1.009 (SEQ ID NO: 352-354) и последовательность константной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 521 или 523.

#### *Антигенсвязывающие белки*

В настоящем изобретении предусмотрены антигенсвязывающие белки для PD-1. В иллюстративных аспектах антигенсвязывающий белок для PD-1 представляет собой антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1, описанные в данном документе. В иллюстративных примерах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат (а) аминокислотную последовательность области 1, определяющей комплементарность (CDR), тяжелой цепи (HC), приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372, и 382, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373, и 383, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (c) аминокислотную последовательность CDR3 HC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374, и 384, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (d) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC), приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из 315, 325, 335, 345, 355, 365,

375, и 385, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (е) аминокислотную последовательность CDR2 LC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376 и 386, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (f) аминокислотную последовательность CDR3 LC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из: 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377, и 387, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; или (g) комбинацию любых двух или более из (a)-(f). В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат аминокислотную последовательность CDR1 LC, аминокислотную последовательность CDR2 LC и аминокислотную последовательность CDR3 LC, приведенные в таблице D, и по меньшей мере 1 или 2 из аминокислотных последовательностей CDR HC, приведенных в таблице D. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит по меньшей мере 3, 4 или 5 аминокислотных последовательностей, представленных под SEQ ID NO: в одном столбце таблицы D.

В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат шесть аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из (a) SEQ ID NOs: 312-317; (b) SEQ ID NOs: 322-327; (c) SEQ ID NOs: 332-337; (d) SEQ ID NOs: 342-347; (e) SEQ ID NOs: 352-357; (f) SEQ ID NOs: 362-367; (g) SEQ ID NOs: 372-377; и (h) SEQ ID NOs: 382-387. В иллюстративных примерах аминокислотные последовательности из таблицы D разделены по меньшей мере одной или несколькими (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) промежуточными аминокислотами. В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат (a) аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, приведенную в таблице E, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из 318, 328, 338, 348, 358, 368, 378, и 388, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; или (b) аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, приведенную в таблице E, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из 319, 329, 339, 349, 359, 369, 379, и 389, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или

которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; или (с) обе из (а) и (b). В иллюстративных вариантах осуществления антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат пару аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из (а) SEQ ID NO: 318 и 319; (b) SEQ ID NO: 328 и 329; (с) SEQ ID NO: 338 и 339; (d) SEQ ID NO: 348 и 349; (е) SEQ ID NO: 358 и 359; (f) SEQ ID NO: 368 и 369; (g) SEQ ID NO: 378 и 379 и (h) SEQ ID NO: 388 и 389. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1 содержат (I) пару аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из (а) SEQ ID NO: 318 и 319; (b) SEQ ID NO: 328 и 329; (с) SEQ ID NO: 338 и 339; (d) SEQ ID NO: 348 и 349; (е) SEQ ID NO: 358 и 359; (f) SEQ ID NO: 368 и 369; (g) SEQ ID NO: 378 и 379 и (h) SEQ ID NO: 388 и 389, и (II) константную область, содержащую любую из SEQ ID NO: 265-267, 282, 284-311, 472-495, и 544-555. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит пару аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из (а) SEQ ID NO: 320 и 321; (b) SEQ ID NO: 330 и 331; (с) SEQ ID NO: 340 и 341; (d) SEQ ID NO: 350 и 351; (е) SEQ ID NO: 360 и 361; (f) SEQ ID NO: 370 и 371; (g) SEQ ID NO: 380 и 381 и (h) SEQ ID NO: 390 и 391. В иллюстративных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с одной или несколькими SEQ ID NO., представленными выше.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок, описанный выше, представляет собой антитело к PD-1 или его антигенсвязывающий фрагмент антитела.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены конъюгаты, содержащие антигенсвязывающий белок для PD-1, описанный в данном документе, и гетерологичный фрагмент. Гетерологичный фрагмент может представлять собой любую молекулу, которая отличается от антигенсвязывающего белка для PD-1, описанного в данном документе. Гетерологичный фрагмент, в иллюстративных аспектах, представляет собой гетерологичный пептид или полипептид, нацеливающее средство, диагностическую метку, полимер, нуклеиновую кислоту, квантовую точку, малую молекулу, токсин, углевод, аминокислоту или другое терапевтическое или диагностическое средство. В иллюстративных аспектах гетерологичный фрагмент представляет собой мутеин IL-21, описанный в данном документе.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены слитые белки,

содержащие антигенсвязывающий белок для PD-1, описанный в данном документе, и гетерологичный полипептид или пептид. В иллюстративных аспектах гетерологичный полипептид представляет собой мутеин IL-21, описанный в данном документе.

#### *Способы получения антител*

Подходящие способы получения антител, антигенсвязывающих фрагментов антител и белковых продуктов на основе антител известны из уровня техники. Например, стандартные гибридомные способы получения антител описаны, например, в Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), и CA. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5<sup>th</sup> Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). Иллюстративный способ получения моноклональных антител к PD-1 по настоящему изобретению предусмотрен в данном документе в разделе "ПРИМЕРЫ".

В зависимости от вида хозяина можно применять различные адъюванты для усиления иммунного ответа, что приводит к большему продуцированию антител хозяином. Такие адъюванты включают без ограничения адъювант Фрейнда, минеральные гели, такие как гидроксид алюминия, и поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, полиолы Pluronic, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, гемоцианин фиссуреллы и динитрофенол. BCG (бацилла Кальмета-Герена) и *Corynebacterium parvum* представляют собой потенциально применимые адъюванты для человека.

Другие способы получения антител обобщены в таблице F.

ТАБЛИЦА F

| Методика                                                                                                                                                                              | Иллюстративные литературные источники                                                                                                                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Способы с применением EBV-трансформированной гибридомы и систем экспрессии на основе бактериофаговых векторов                                                                         | Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984), Roder et al., Methods Enzymol., 121, 140-67 (1986), и Huse et al., Science, 246, 1275-81 (1989)). |
| Способы получения антител у животных, отличных от человека                                                                                                                            | Патенты США 5545806, 5569825 и 5714352 и публикация заявки на патент США № 2002/0197266                                                                          |
| Индукцирование продуцирования <i>in vivo</i> в популяции лимфоцитов или путем скрининга рекомбинантных библиотек иммуноглобулинов или панелей высокоспецифичных связывающих реагентов | Orlandi et al (Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837; 1989), и Winter G and Milstein C (Nature 349: 293-299, 1991).                                                   |
| Способы получения рекомбинантных белков                                                                                                                                               | "Protein production and purification" Nat Methods 5(2): 135-146 (2008).                                                                                          |
| Фаговый дисплей                                                                                                                                                                       | Janeway et al., выше, Huse et al., выше, и патент                                                                                                                |

|                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                    | США 6265150. Сходные способы также описаны в патенте США № 5403484; патенте США № 5571698; патенте США № 5837500; патенте США № 5702892. Методики описаны в патенте США № 5780279; патенте США № 5821047; патенте США № 5824520; патенте США № 5855885; патенте США № 5858657; патенте США № 5871907; патенте США № 5969108; патенте США № 6057098 и патенте США № 6225447. |
| Антитела могут продуцироваться трансгенными мышами | Патенты США №№ 5545806 и 5569825 и Janeway et al., выше.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

Способы тестирования антител в отношении способности связываться с PD-1 независимо от того, каким образом получены антитела, известны из уровня техники и включают любой анализ связывания антитела и антигена, такой как, например, радиоиммунологический анализ (RIA), ELISA, вестерн-блоттинг, иммунопреципитация, SPR и анализы конкурентного ингибирования (см., например, Janeway et al., ниже, и публикацию заявки на патент США № 2002/0197266, а также представленный выше раздел, относящийся к конкурентным анализам). Другие анализы связывания, например, анализы конкурентного связывания или конкурентные анализы, в которых тестируют способность антитела конкурировать со вторым антителом за связывание с антигеном или с его эпитопом, известны из уровня техники и могут применяться для тестирования способности антитела связываться с PD-1. См., например, публикацию заявки на патент США № US20140178905, Chand et al., *Biologicals* 46: 168-171 (2017); Liu et al., *Anal Biochem* 525: 89-91 (2017); и Goolia et al., *J Vet Diagn Invest* 29(2): 250-253 (2017). Также из уровня техники известны другие способы сравнения двух антител, и они включают, например, поверхностный плазмонный резонанс (SPR). SPR можно применять для определения констант связывания антитела и второго антитела, и две константы связывания можно сравнивать.

*Гетерологичные фрагменты: полимеры, углеводы, липиды и терапевтические средства*

В иллюстративных вариантах осуществления конъюгат по настоящему изобретению содержит мутеин IL-21, связанный с полимером. В некоторых вариантах осуществления полимер выбран из группы, состоящей из полиамидов, поликарбонатов, полиалкиленов и их производных, в том числе полиалкиленгликолей, полиалкиленоксидов, полиалкилентерефталатов, полимеров акриловых и метакриловых сложных эфиров, в том числе поли(метилметакрилата), поли(этилметакрилата), поли(бутилметакрилата), поли(изобутилметакрилата), поли(гексилметакрилата), поли(изодецилметакрилата),

поли(лаурилметакрилата), поли(фенилметакрилата), поли(метилакрилата), поли(изопропилакрилата), поли(изобутилакрилата) и поли(октадецилакрилата), поливиниловых полимеров, в том числе поливиниловых спиртов, поливиниловых простых эфиров, поливиниловых сложных эфиров, поливинилгалогенидов, поли(винилацетата) и поливинилпирролидона, полигликолидов, полисилоксанов, полиуретанов и их сополимеров, разновидностей целлюлозы, в том числе алкилцеллюлозы, разновидностей гидроксилалкилцеллюлозы, простых эфиров целлюлозы, сложных эфиров целлюлозы, разновидностей нитроцеллюлозы, метилцеллюлозы, этилцеллюлозы, гидроксипропилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, гидроксипропилметилцеллюлозы, ацетата целлюлозы, пропионата целлюлозы, ацетобутирата целлюлозы, ацетофталата целлюлозы, карбоксиэтилцеллюлозы, триацетата целлюлозы и натриевой соли сульфатной целлюлозы, полипропилена, полиэтиленов, в том числе поли(этиленгликоля), поли(этиленоксида) и поли(этилентерефталата), и полистирола. В конкретных вариантах осуществления полимер представляет собой полиалкиленгликоль, в том числе, например, полиэтиленгликоль (PEG).

В иллюстративных вариантах осуществления конъюгат по настоящему изобретению содержит мутеин IL-21, связанный с углеводом. В некоторых вариантах осуществления углевод представляет собой моносахарид (например, глюкозу, галактозу, фруктозу), дисахарид (например, сахарозу, лактозу, мальтозу), олигосахарид (например, раффинозу, стахиозу) или полисахарид (например, крахмал, амилозу, амилопектин, целлюлозу, хитин, каллозу, ламинарин, ксилан, маннан, фукоидан или галактоманнан).

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный фрагмент представляет собой липид. Липид в некоторых вариантах осуществления представляет собой жирную кислоту, эйкозаноид, простагландин, лейкотриен, тромбоксан, N-ацилэтаноламин, глицеролипид (например, моно-, ди-, тризамещенные глицерины), глицерофосфолипид (например, фосфатидилхолин, фосфатидилинозитол, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин), сфинголипид (например, сфингозин, церамид), стериновый липид (например, стероид, холестерин), преноловый липид, сахаролипид или поликетид, масло, воск, холестерин, стерин, жирорастворимый витамин, моноглицерид, диглицерид, триглицерид, фосфолипид.

В иллюстративных вариантах осуществления конъюгат по настоящему изобретению содержит мутеин IL-21, связанный с терапевтическим средством. Терапевтическое средство может представлять собой любое терапевтическое средство, известное из уровня техники. В иллюстративных аспектах терапевтическое средство представляет собой средство иммунотерапии в том смысле, что данное средство стимулирует иммунный ответ. В иллюстративных аспектах средство иммунотерапии представляет собой противораковую вакцину. В иллюстративных аспектах средство иммунотерапии представляет собой моноклональное антитело. В иллюстративных аспектах средство иммунотерапии представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа, например, ингибитор CTLA4, PD-1, PD-L1. В иллюстративных примерах моноклональное антитело является

специфичным к белку в сигнальном пути контрольной точки иммунного ответа. Белок сигнального пути контрольной точки иммунного ответа может представлять собой, например, CTLA4, PD-1, PD-L1, B7-H3, B7H4 или TIM3. Например, антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с атезолизумабом, авелумабом, ипилимумабом, тремелиумабом, BMS-936558, MK3475, CT-011, AM-224, MDX-1105, IMP321, MGA271.

В иллюстративных аспектах терапевтическое средство представляет собой цитокин, лимфокин, фактор роста или гемопоэтический фактор, эффективный в ингибировании метастазирования опухоли и/или обладающий антипролиферативным эффектом в отношении по меньшей мере одной популяции клеток. Такой цитокины, лимфокины, факторы роста или другие гемопоэтические факторы включают без ограничения M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN, TNF $\alpha$ , TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, тромбопоэтин, фактор роста стволовых клеток и эритропоэтин. Дополнительные факторы роста для применения в данном документе включают ангиогенин, костный морфогенетический белок 1, костный морфогенетический белок 2, костный морфогенетический белок 3, костный морфогенетический белок 4, костный морфогенетический белок 5, костный морфогенетический белок 6, костный морфогенетический белок 7, костный морфогенетический белок 8, костный морфогенетический белок 9, костный морфогенетический белок 10, костный морфогенетический белок 11, костный морфогенетический белок 12, костный морфогенетический белок 13, костный морфогенетический белок 14, костный морфогенетический белок 15, рецептор IA костного морфогенетического белка, рецептор IB костного морфогенетического белка, нейротрофический фактор головного мозга, цилиарный нейротрофический фактор, рецептор  $\alpha$  цилиарного нейротрофического фактора, цитокин-индуцируемый хемотаксический фактор нейтрофилов 1, цитокин-индуцируемый хемотаксический фактор нейтрофилов 2  $\alpha$ , цитокин-индуцируемый хемотаксический фактор нейтрофилов 2  $\beta$ ,  $\beta$ -фактор роста эндотелиальных клеток, эндотелин 1, эпителиальный аттрактант нейтрофилов, рецептор  $\alpha$  1 нейротрофического фактора линии глиальных клеток, рецептор  $\alpha$  2 нейротрофического фактора линии глиальных клеток, белок, связанный с ростом, белок  $\alpha$ , связанный с ростом, белок  $\beta$ , связанный с ростом, белок  $\gamma$ , связанный с ростом, гепарин-связывающий эпидермальный фактор роста, фактор роста гепатоцитов, рецептор фактора роста гепатоцитов, инсулиноподобный фактор роста I, рецептор инсулиноподобного фактора роста, инсулиноподобный фактор роста II, белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста, фактор роста кератиноцитов, фактор, ингибирующий лейкоз, рецептор  $\alpha$  фактора, ингибирующего лейкоз, фактор роста нервов, рецептор фактора роста нервов, нейротрофин-3, нейротрофин-4, фактор, стимулирующий рост пре-B-клеток, фактор роста стволовых клеток, рецептор фактора роста стволовых клеток, трансформирующий фактор роста  $\alpha$ , трансформирующий фактор роста  $\beta$ , трансформирующий фактор роста  $\beta$ 1,

трансформирующий фактор роста  $\beta 1.2$ , трансформирующий фактор роста  $\beta 2$ , трансформирующий фактор роста  $\beta 3$ , трансформирующий фактор роста  $\beta 5$ , латентный трансформирующий фактор роста  $\beta 1$ , белок I, связывающий трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белок II, связывающий трансформирующий фактор роста  $\beta$ , белок III, связывающий трансформирующий фактор роста  $\beta$ , рецептор фактора некроза опухоли I типа, рецептор фактора некроза опухоли II типа, рецептор активатора плазминогена урокиназного типа, а также химерные белки на их основе и их биологически или иммунологически активные фрагменты. В иллюстративных вариантах осуществления терапевтическое средство включает в себя антитело, специфичное к любому из вышеуказанных цитокинов, лимфокинов, факторов роста или других гемопоэтических факторов.

#### *Нуклеиновые кислоты*

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую мутеин IL-21 по настоящему изобретению, конъюгат, содержащий мутеин IL-21, или слитый белок, содержащий мутеин IL-21. Например, нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь антитела к PD-1, за которой расположена нуклеотидная последовательность, кодирующая мутеин IL-21 по настоящему изобретению. Нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь, и нуклеотидная последовательность, кодирующая мутеин IL-21, могут фланкировать нуклеотидную последовательность, кодирующую пептидный линкер, содержащий аминокислотную последовательность GGGGS (SEQ ID NO: 262). В альтернативных аспектах нуклеиновая кислота не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую пептидный линкер, и нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь антитела к PD-1, находится в тандеме с нуклеотидной последовательностью, кодирующей мутеин IL-21 по настоящему изобретению.

В иллюстративных аспектах нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую мутеин IL-21, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 3-21, 23-56, 58-112, 114-208, 210-222, 224-255 и 283 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 3-21, 23-56, 58-112, 114-208, 210-222, 224-255, и 283.

В иллюстративных аспектах нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую пептидный линкер под SEQ ID NO: 262 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере



приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 262.

В иллюстративных аспектах нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность константной области антитела, описанной в данном документе, слитую с аминокислотной последовательностью любого мутеина IL-21, описанного в данном документе. В иллюстративных примерах нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 265-267 и 282 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 265-267 и 282, слитую с любой из SEQ ID NO: 3-21, 23-56, 58-112, 114-208, 210-222, 224-255, и 283 или аминокислотной последовательностью, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3-21, 23-56, 58-112, 114-208, 210-222, 224-255, и 283. В иллюстративных аспектах нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 268-281 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 268-281.

В иллюстративных аспектах нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело к PD-1, содержащее аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи под любым из SEQ ID NO: 265-267, 282, 284-311, 472-495 и 544-555 или аминокислотную последовательность, которая характеризуется по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или характеризуется более чем приблизительно 90% (например, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%) идентичностью последовательности с любой из SEQ ID NO: 265-267, 282, 284-311, 472-495 и 544-555.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок для PD-1 по настоящему изобретению. В иллюстративных аспектах нуклеотидная последовательность содержит последовательность, кодирующую CDR тяжелой цепи или CDR легкой цепи, вариабельную область тяжелой цепи или вариабельную область легкой цепи или последовательность тяжелой цепи или последовательность легкой цепи. См. таблицу G ниже. В иллюстративных примерах нуклеотидная последовательность содержит любую из SEQ ID NO: 392-471. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены пары нуклеотидных последовательностей, содержащие (a) SEQ ID NO: 398 и 399, (b) SEQ ID NO: 408 и 409, (c) SEQ ID NO: 418 и 419, (d) SEQ ID NO: 428 и 429, (e) SEQ ID NO: 438 и 439, (f) SEQ ID NO: 448 и 449, (g) SEQ ID NO: 458 и 459 или (h) SEQ ID NO: 468 и 469. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены пары нуклеотидных последовательностей, содержащие (a) SEQ ID NO: 400 и 401, (b) SEQ ID NO: 410 и 411, (c) SEQ ID NO: 420 и 421, (d) SEQ ID NO: 430 и 431, (e) SEQ ID NO: 440 и 441, (f) SEQ ID NO: 450 и 451, (g) SEQ ID NO: 460 и 461 или (h) SEQ ID NO: 470 и 471.

ТАБЛИЦА G

|                  | <b>20A2</b> | <b>20C1</b> | <b>22D4</b> | <b>20C1.00</b><br><b>6</b> | <b>20C1.00</b><br><b>9</b> | <b>20A2.00</b><br><b>3</b> | <b>22D4.00</b><br><b>6</b> | <b>22D4.01</b><br><b>7</b> |
|------------------|-------------|-------------|-------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| CDR1 HC          | 392         | 402         | 412         | 422                        | 432                        | 442                        | 452                        | 462                        |
| CDR2 HC          | 393         | 403         | 413         | 423                        | 433                        | 443                        | 453                        | 463                        |
| CDR3 HC          | 394         | 404         | 414         | 424                        | 434                        | 444                        | 454                        | 464                        |
| CDR1 LC          | 395         | 405         | 415         | 425                        | 435                        | 445                        | 455                        | 465                        |
| CDR2 LC          | 396         | 406         | 416         | 426                        | 436                        | 446                        | 456                        | 466                        |
| CDR3 LC          | 397         | 407         | 417         | 427                        | 437                        | 447                        | 457                        | 467                        |
| ВАРИАБ<br>ЕЛЬНАЯ | 398         | 408         | 418         | 428                        | 438                        | 448                        | 458                        | 468                        |

|                               |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| ОБЛАСТЬ<br>НС                 |     |     |     |     |     |     |     |     |
| ВАРИАБЕЛЬНАЯ<br>ОБЛАСТЬ<br>LC | 399 | 409 | 419 | 429 | 439 | 449 | 459 | 469 |
| ПОЛНОРАЗМЕРНАЯ<br>НС          | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 |
| ПОЛНОРАЗМЕРНАЯ<br>LC          | 401 | 411 | 421 | 431 | 441 | 451 | 461 | 471 |

В иллюстративных аспектах молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую конъюгат или слитый белок по настоящему изобретению. Термин "нуклеиновая кислота", используемый в данном документе, включает "полинуклеотид", "олигонуклеотид" и "молекулу нуклеиновой кислоты" и, как правило, означает полимер ДНК или РНК или их модифицированные формы, которые могут быть одонитевыми или двухнитевыми, синтезированными или полученными (например, выделенными и/или очищенными) из природных источников, которые могут содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды и которые могут содержать природную, неприродную или измененную межнуклеотидную связь, такую как фосфориамидатная связь или фосфотиоатная связь, вместо фосфодиэфирной, находящейся между нуклеотидами немодифицированного олигонуклеотида. Нуклеиновая кислота может содержать любую нуклеотидную последовательность, которая кодирует любой из антигенсвязывающих белков или полипептидов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота не содержит каких-либо вставок, делеций, инверсий и/или замен. В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит одну или несколько вставок, делеций, инверсий и/или замен.

В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению являются рекомбинантными. Используемый в данном документе термин "рекомбинантный" относится к (i) молекулам, конструируемым вне живых клеток путем соединения сегментов природной или синтетической нуклеиновой кислоты с молекулами нуклеиновой кислоты, которые могут реплицироваться в живой клетке, или (ii) молекулам, образующимся в результате репликации молекул, описанных в (i) выше. Для целей данного документа репликация может представлять собой репликацию *in vitro* или репликацию *in vivo*.

Нуклеиновые кислоты в некоторых аспектах конструируют на основе реакций

химического синтеза и/или ферментативного лигирования с применением процедур, известных из уровня техники. См., например, Sambrook et al., выше; и Ausubel et al., выше. Например, нуклеиновую кислоту можно синтезировать химическим путем с использованием встречающихся в природе нуклеотидов или различным образом модифицированных нуклеотидов, разработанных для повышения биологической стабильности молекулы или для повышения физической стабильности дуплекса, образующегося при гибридизации (например, фосфотиоатных производных и акридинзамещенных нуклеотидов). Примеры модифицированных нуклеотидов, которые можно использовать для получения нуклеиновых кислот, включают без ограничения 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-хлор урацил, 5-йод урацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, бета-D-галактозилквеуозин, инозин, N<sup>6</sup>-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилюридин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N-замещенный аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеуозин, 5'-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N<sup>6</sup>-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусную кислоту (v), вибутоксозин, псевдоурацил, квеуозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, метиловый сложный эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил)урацил и 2,6-диаминопурин. В качестве альтернативы, одна или несколько нуклеиновых кислот по настоящему изобретению могут быть приобретены у компаний, таких как Macromolecular Resources (Форт-Коллинс, Колорадо) и Synthegen (Хьюстон, Техас).

### *Векторы*

В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению включены в состав вектора. В этом отношении в настоящем изобретении предусмотрены векторы, содержащие любую из раскрытых в настоящем изобретении нуклеиновых кислот. В иллюстративных аспектах вектор представляет собой рекомбинантный вектор экспрессии. Для целей данного документа термин "рекомбинантный вектор экспрессии" означает генетически модифицированную олигонуклеотидную или полинуклеотидную конструкцию, которая обеспечивает экспрессию мРНК, белка, полипептида или пептида в клетке-хозяине, если конструкция содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую мРНК, белок, полипептид или пептид, и вектор приводят в контакт с клеткой в условиях, достаточных для экспрессии мРНК, белка, полипептида или пептида в клетке. Векторы по настоящему изобретению не являются целиком и полностью встречающимися в природе. Однако, части векторов могут быть встречающимися в природе. Раскрытые в настоящем изобретении векторы могут содержать любой тип нуклеотидов, в том числе без ограничения ДНК и РНК, которые могут быть однонитевыми или двухнитевыми, синтезированными или полученными частично из природных источников и которые могут содержать природные, неприродные или измененные нуклеотиды. Векторы могут

содержать встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе межнуклеотидные связи или оба этих типа связей. В некоторых аспектах измененные нуклеотиды или не встречающиеся в природе межнуклеотидные связи не служат помехой для транскрипции или репликации вектора.

Вектор по настоящему изобретению может представлять собой любой подходящий вектор и может применяться для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. Подходящие векторы включают векторы, разработанные для воспроизводства и размножения или для экспрессии или как для того, так и для другого, такие как плазмиды и вирусы. Вектор может быть выбран из группы, состоящей из серии pUC (Fermentas Life Sciences), серии pBluescript (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния), серии pET (Novagen, Мэдисон, Висконсин), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Уппсала, Швеция) и серии pEX (Clontech, Пало-Альто, Калифорния). Также могут применяться бактериофаговые векторы, такие как  $\lambda$ GT10,  $\lambda$ GT11,  $\lambda$ ZapII (Stratagene),  $\lambda$ EMBL4 и  $\lambda$ NMI 149. Примеры векторов экспрессии в клетках растений включают pBIOI, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). Примеры векторов экспрессии в клетках животных включают pEUK-CI, pMAM и pMAMneo (Clontech). В некоторых аспектах вектор представляет собой вирусный вектор, например, ретровирусный вектор.

Векторы по настоящему изобретению могут быть получены с применением стандартных методик рекомбинантных ДНК, описанных, например, в Sambrook et al., выше, и Ausubel et al., выше. Конструкции векторов экспрессии, которые являются кольцевыми или линейными, могут быть получены так, чтобы они содержали систему репликации, функциональную в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации могут быть получены, например, из CoIE1, плазмиды размером 2 мкм,  $\lambda$ , SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота и т. п.

В некоторых аспектах вектор содержит регуляторные последовательности, такие как кодоны инициации и терминации транскрипции и трансляции, которые являются специфичными в отношении типа хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), в организм которого должен быть введен вектор, в случае необходимости и с учетом того, лежит ли в основе вектора ДНК или РНК.

Вектор может содержать один или несколько маркерных генов, которые обеспечивают возможность отбора трансформированных или трансфицированных хозяев. Маркерные гены включают гены, отвечающие за устойчивость к биоцидам, например, устойчивость к антибиотикам, тяжелым металлам и т. д., комплементацию у ауксотрофного хозяина для обеспечения прототрофности и т. п. Подходящие маркерные гены для раскрытых в настоящем изобретении векторов экспрессии включают, например, гены устойчивости к неомицину/G418, гены устойчивости к гигромицину, гены устойчивости к гистидинолу, гены устойчивости к тетрациклину и гены устойчивости к ампициллину.

Вектор может содержать нативный или ненативный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид (в том числе его функциональные части и функциональные варианты), или с нуклеотидной

последовательностью, которая является комплементарной нуклеотидной последовательности, кодирующей IL-21, конъюгат или слитый белок, или которая гибридизируется с ней. Выбор промоторов, например, сильных, слабых, индуцируемых, тканеспецифичных и специфичных для стадии развития, находится в пределах компетенции среднего специалиста в данной области. Аналогично, объединение нуклеотидной последовательности с промотором также находится в пределах компетенции специалиста в данной области. Промотор может представлять собой невирусный промотор или вирусный промотор, например, промотор цитомегаловируса (CMV), промотор SV40, промотор RSV и промотор, находящийся в длинном концевом повторе вируса стволовых клеток мышей.

#### *Клетки-хозяева*

В данном документе предусмотрены клетки-хозяева, содержащие нуклеиновую кислоту или вектор по настоящему изобретению. Используемый в данном документе термин "клетка-хозяин" относится к любому типу клетки, которая может содержать раскрытый в настоящем изобретении вектор и способна к продуцированию продукта экспрессии, кодируемого нуклеиновой кислотой (например, мРНК, белка). Клетка-хозяин в некоторых аспектах представляет собой адгезивную клетку или суспендированную клетку, т. е. клетку, которая растет в суспензии. Клетка-хозяин в иллюстративных аспектах представляет собой культивируемую клетку или первичную клетку, т. е. выделенную непосредственно из организма, например, человека. Клетка-хозяин может относиться к любому типу клеток, может происходить из любого типа ткани и может находиться на любой стадии развития.

В иллюстративных аспектах клетка представляет собой эукариотическую клетку, в том числе без ограничения клетку дрожжей, клетку нитчатого гриба, клетку простейшего, клетку водоросли, клетку насекомого или клетку млекопитающего. Такие клетки-хозяева описаны в уровне техники. См., например, Frenzel, et al., *Front Immunol* 4: 217 (2013). В иллюстративных аспектах эукариотические клетки представляют собой клетки млекопитающих. В иллюстративных аспектах клетки млекопитающих представляют собой клетки млекопитающих, отличных от человека. В некоторых аспектах клетки представляют собой клетки яичника китайского хомячка (CHO) и их производные (например, CHO-K1, CHO pro-3, CS9), клетки миеломы мыши (например, NS0, GS-NS0, Sp2/0), клетки, сконструированные с дефицитом активности дигидрофолатредуктазы (DHFR) (например, DUKX-X11, DG44), клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK293) или их производные (например, HEK293T, HEK293-EBNA), клетки почки африканской зеленой марышки (например, клетки COS, клетки VERO), раковые клетки шейки матки человека (например, HeLa), эпителиальные клетки остеосаркомы кости человека U2-OS, базальные клетки альвеолярного эпителия аденокарциномы человека A549, клетки фибросаркомы человека HT1080, клетки опухоли головного мозга мыши CAD, клетки эмбриональной карциномы P19, эмбриональные фибробластные клетки мыши NIH 3T3, *фибробластные* клетки мыши L929, клетки нейробластомы мыши N2a, раковые клетки молочной железы

человека MCF-7, клетки ретинобластомы Y79, клетки ретинобластомы человека SO-Rb50, раковые клетки печени человека Hep G2, клетки В-клеточной миеломы мыши J558L или клетки почки новорожденного хомяка (BHK) (Gaillet et al. 2007; Khan, Adv Pharm Bull 3(2): 257-263 (2013)). В конкретном варианте осуществления клетка-хозяин представляет собой CS9 (линия клеток CHO).

В некоторых аспектах для целей амплификации или репликации вектора клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку, например, бактериальную клетку.

Также в настоящем изобретении предусмотрена популяция клеток, содержащая по меньшей мере одну клетку-хозяина, описанную в данном документе. Популяция клеток в некоторых аспектах представляет собой неоднородную популяцию, содержащую клетку-хозяина, которая содержит описанные векторы, в дополнение к по меньшей мере одной другой клетке, которая не содержит какого-либо вектора. В качестве альтернативы, в некоторых аспектах популяция клеток представляет собой по сути однородную популяцию, в случае с которой популяция содержит главным образом клетки-хозяева (например, по существу состоит из них), содержащие вектор. Популяция в некоторых аспектах представляет собой клональную популяцию клеток, в которой все клетки популяции являются клонами одной клетки-хозяина, содержащей вектор, так что все клетки популяции содержат вектор. В иллюстративных вариантах осуществления настоящего изобретения популяция клеток представляет собой клональную популяцию, содержащую клетки-хозяева, которые содержат вектор, описанный в данном документе.

#### *Фармацевтические композиции*

В данном документе предусмотрены композиции, содержащие мутеин IL-21, конъюгат, содержащий мутеин IL-21, слитый белок, содержащий мутеин IL-21 и полипептид, антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антитело к PD-1), конъюгат, содержащий антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антитело к PD-1), слитый белок, содержащий антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антитело к PD-1), нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина по настоящему изобретению или их комбинацию. Композиции в некоторых аспектах содержат мутеин IL-21, антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антитело к PD-1), конъюгат, слитый белок, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина по настоящему изобретению или их комбинацию в выделенной и/или очищенной форме. В некоторых аспектах композиция содержит один тип (например, структуру) мутеина IL-21, антигенсвязывающего белка для PD-1 (например, антитела к PD-1), конъюгата, слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или клетки-хозяина по настоящему изобретению или содержит комбинацию двух или более различных типов (например, различных структур) мутеинов IL-21, антигенсвязывающих белков для PD-1, конъюгатов, слитых белков, нуклеиновых кислот, векторов или клеток-хозяев по настоящему изобретению.

В иллюстративных аспектах композиция содержит средства, которые усиливают физико-химические свойства мутеина IL-21, антигенсвязывающего белка для PD-1 (например, антитела к PD-1), конъюгата, слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или

клетки-хозяина, например, посредством стабилизации, например, мутеина IL-21 или слитого белка при определенных температурах (например, комнатной температуре), увеличения срока годности, уменьшения разложения, например, окислительного разложения, опосредованного протеазами, увеличения периода полувыведения, например, мутеина IL-21 или слитого белка и т. д. В некоторых аспектах композиция содержит любое из средств, раскрытых в данном документе, в качестве гетерологичного фрагмента или конъюгированного фрагмента, необязательно в смеси с мутеинами IL-21, конъюгатами, слитыми белками, нуклеиновыми кислотами, векторами или клетками-хозяевами по настоящему изобретению.

В иллюстративных аспектах настоящего изобретения композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавители или наполнитель. В некоторых вариантах осуществления мутеина IL-21, антигенсвязывающие белки для PD-1 (например, антитела к PD-1), конъюгаты, слитые белки, нуклеиновые кислоты, векторы или клетки-хозяева, раскрытые в настоящем изобретении (далее в данном документе называемые "активными средствами"), составлены в виде фармацевтической композиции, содержащей активное средство наряду с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителем или наполнителем. В этом отношении в настоящем изобретении дополнительно предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие активное средство (т. е. любое из мутеинов IL-21, антигенсвязывающих белков для PD-1 (например, антител к PD-1), конъюгатов, слитых белков, нуклеиновых кислот, векторов или клеток-хозяев по настоящему изобретению), при этом данная фармацевтическая композиция предназначена для введения субъекту, например, млекопитающему.

В некоторых вариантах осуществления активное средство присутствует в фармацевтической композиции при уровне чистоты, подходящем для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления активное средство характеризуется уровнем чистоты, составляющим по меньшей мере приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99%, с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат активное средство в концентрации от приблизительно 0,001 до приблизительно 30,0 мг/мл.

В иллюстративных аспектах фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемый носитель. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любой из стандартных фармацевтических носителей, таких как фосфатно-солевой буферный раствор, вода, эмульсии, такие как эмульсия типа "масло в воде" или "вода в масле", и различные типы смачивающих средств. Термин также охватывает любое средство, одобренное регуляторным органом федерального правительства США или упомянутое в Фармакопее США для применения у животных, в том числе у людей.

Фармацевтическая композиция может содержать любые фармацевтически



приемлемые ингредиенты, в том числе, например, подкисляющие средства, добавки, адсорбенты, аэрозольные пропелленты, средства для вытеснения воздуха, подщелачивающие средства, противослеживающие средства, антикоагулянты, противомикробные консерванты, антиоксиданты, антисептики, основания, связующие средства, буферные средства, хелатообразующие средства, средства для нанесения покрытий, окрашивающие средства, высушивающие средства, детергенты, разбавители, дезинфицирующие средства, разрыхлители, диспергирующие средства, средства для усиления растворения, красители, смягчающие средства, эмульгирующие средства, стабилизаторы эмульсий, наполнители, пленкообразующие средства, усилители вкуса и запаха, ароматизирующие средства, средства, препятствующие слеживанию и комкованию, гелеобразующие средства, гранулирующие средства, увлажняющие средства, смазывающие вещества, мукоадгезивные средства, основы для мазей, мази, маслянистые среды, органические основания, основы для пастилок, пигменты, пластификаторы, полирующие средства, консерванты, секвестранты, средства, способствующие проникновению через кожу, солубилизирующие средства, растворители, стабилизаторы, основы для суппозиторий, поверхностно-активные средства, поверхностно-активные вещества, суспендирующие средства, подсластители, терапевтические средства, загустители, средства, регулирующие тоничность, противотоксические средства, средства, повышающие вязкость, водопоглощающие вещества, совместные растворители, смешивающиеся с водой, водосмягчающие вещества или смачивающие средства. См., например, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Third Edition, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000), которая включена посредством ссылки во всей своей полноте. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980), которая включена посредством ссылки во всей своей полноте.

В иллюстративных аспектах фармацевтическая композиция содержит материалы для составления, которые являются нетоксичными для получающих их пациентов в используемых дозах и концентрациях. В конкретных вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат активное средство и одно или несколько из фармацевтически приемлемых солей; полиолов; поверхностно-активных веществ; средств, регулирующих осмотический баланс; средств, регулирующих тоничность; антиоксидантов; антибиотиков; противогрибковых средств; объемообразующих средств; лиопротекторов; пеногасителей; хелатообразующих средств; консервантов; окрашивающих средств; обезболивающих средств или дополнительных фармацевтических средств. В иллюстративных аспектах фармацевтическая композиция содержит один или несколько полиолов и/или одно или несколько поверхностно-активных веществ, необязательно в дополнение к одному или нескольким наполнителям, в том числе без ограничения фармацевтически приемлемым солям; средствам, регулирующим осмотический баланс (средствам, регулирующим тоничность); антиоксидантам; антибиотикам; противогрибковым средствам; объемообразующим средствам; лиопротекторам; пеногасителям; хелатообразующим средствам; консервантам; красящим веществам и

обезболивающим средствам.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы для составления, предназначенные для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникающей способности композиции. В таких вариантах осуществления подходящие материалы для составления включают без ограничения аминокислоты (такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин); противомикробные вещества; антиоксиданты (такие как аскорбиновая кислота, сульфит натрия или гидросульфит натрия); буферы (такие как боратный, бикарбонатный, Tris-HCl, цитратные, фосфатные буферы или буферы на основе других органических кислот); объемообразующие средства (такие как маннит или глицин); хелатирующие средства (такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA)); комплексообразующие средства (такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин); наполнители; моносахариды; дисахариды и другие углеводы (такие как глюкоза, манноза или декстрины); белки (такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины); окрашивающие, ароматизирующие и разбавляющие средства; эмульгирующие средства, гидрофильные полимеры (такие как поливинилпирролидон); низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как ион натрия); консерванты (такие как хлорид бензалкония, бензойная кислота, салициловая кислота, тимеросал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или пероксид водорода); растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты (такие как маннит или сорбит); суспендирующие средства; поверхностно-активные вещества или смачивающие средства (такие как Pluronic, PEG, сорбитановые сложные эфиры, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, Triton, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапол); средства, увеличивающие стабильность (такие как сахароза или сорбит); средства, увеличивающие тоничность (такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит); среды для доставки; разбавители; наполнители и/или фармацевтические вспомогательные средства. См. REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18<sup>th</sup> Edition, (A. R. Gennaro, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

Фармацевтические композиции можно составлять так, чтобы достичь физиологически совместимого значения pH. В некоторых вариантах осуществления значение pH фармацевтической композиции может составлять, например, от приблизительно 4 или приблизительно 5 до приблизительно 8,0, или от приблизительно 4,5 до приблизительно 7,5, или от приблизительно 5,0 до приблизительно 7,5. В иллюстративных вариантах осуществления значение pH фармацевтической композиции составляет от 5,5 до 7,5.

#### *Пути введения*

Что касается настоящего изобретения, активное средство или фармацевтическую

композицию, содержащую его, можно вводить субъекту посредством любого подходящего пути введения. Например, активное средство можно вводить субъекту посредством парентерального, назального, перорального, легочного, местного, вагинального или ректального введения. Следующее обсуждение путей введения предусмотрено лишь для демонстрации иллюстративных вариантов осуществления и не должно быть истолковано как ограничивающее объем каким-либо образом.

Составы, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные изотонические стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические вещества, и растворы, которые делают состав изотоническим по отношению к крови предполагаемого пациента, получающего его, а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспендирующие средства, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. Термин "парентеральный" означает вводимый посредством не пищеварительного канала, а какого-либо другого пути, такого как подкожный, внутримышечный, интраспинальный или внутривенный. Активное средство по настоящему изобретению можно вводить с физиологически приемлемым разбавителем в фармацевтическом носителе, таком как стерильная жидкость или смесь жидкостей, которые включают воду, солевой раствор, водные растворы декстрозы и родственных сахаров, спирт, такой как этанол или гексадециловый спирт, гликоль, такой как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, диметилсульфоксид, глицерин, кетали, такие как 2,2-диметил-1,3-диоксолан-4-метанол, эфиры, поли(этиленгликоль) 400, масла, жирные кислоты, сложные эфиры или глицериды жирных кислот или ацетилированные глицериды жирных кислот, с добавлением или без добавления фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества, такого как мыло или детергент, суспендирующего средства, такого как пектин, карбомеры, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или карбоксиметилцеллюлоза, или эмульгирующих средств и других фармацевтических вспомогательных средств.

Масла, которые можно применять в составах для парентерального введения, включают нефтяные, животные, растительные или синтетические масла. Конкретные примеры масел включают арахисовое, соевое, кунжутное, хлопковое, кукурузное, оливковое масло, вазелин и минеральное масло. Подходящие жирные кислоты для применения в составах для парентерального введения включают олеиновую кислоту, стеариновую кислоту и изостеариновую кислоту. Этилолеат и изопропилмиристат являются примерами подходящих сложных эфиров жирных кислот.

Подходящие виды мыла для применения в составах для парентерального введения включают соли жирных кислот и щелочных металлов, аммония и триэтаноламина, и подходящие детергенты включают (а) катионные детергенты, такие как, например, диметилдиалкиламмонийгалогениды и алкилпиридинийгалогениды, (b) анионные детергенты, такие как, например, алкил-, арил- и олефинсульфонаты, алкил-, олефин-, эфир- и моноглицеридсульфаты и сульфосукцинаты, (с) неионогенные детергенты, такие как, например, оксиды аминов жирного ряда, алканоламиды жирных кислот и сополимеры

полиоксиэтилена и полипропилена, (d) амфотерные детергенты, такие как, например, алкил- $\beta$ -аминопропионаты и четвертичные аммониевые соли 2-алкилимидазолина, и (e) их смеси.

Составы для парентерального введения в некоторых вариантах осуществления содержат от приблизительно 0,5% до приблизительно 25% по весу активного средства по настоящему изобретению в растворе. Можно применять консерванты и буферы. С целью сведения до минимума или устранения раздражения в месте инъекции такие композиции могут содержать одно или несколько неионогенных поверхностно-активных веществ, характеризующихся гидрофильно-липофильным балансом (HLB), составляющим от приблизительно 12 до приблизительно 17. Количество поверхностно-активного вещества в таких составах будет, как правило, находиться в диапазоне от приблизительно 5% до приблизительно 15% по весу. Подходящие поверхностно-активные вещества включают сорбитановые сложные эфиры жирных кислот и полиэтиленгликоля, такие как сорбитанмоноолеат, и высокомолекулярные аддукты этиленоксида и гидрофобного основания, образованные путем конденсации пропиленоксида с пропиленгликолем. Составы для парентерального введения в некоторых аспектах представлены в однодозовых или многодозовых запечатанных контейнерах, таких как ампулы и флаконы, и могут храниться в высушенном путем сублимации (лиофилизированном) состоянии, которое требует лишь добавления стерильного жидкого наполнителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением. Инъекционные растворы и суспензии для немедленного применения в некоторых аспектах получают из стерильных порошков, гранул и таблеток описанного ранее типа.

Инъекционные составы представляют собой составы в соответствии с настоящим изобретением. Требования к эффективным фармацевтическим носителям для инъекционных композиций хорошо известны средним специалистам в данной области (см., например, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982), и *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4th ed., pages 622-630 (1986)).

#### Дозы

Считается, что активные средства по настоящему изобретению являются применимыми в способах ингибирования передачи сигнала с помощью PD-1 с обеспечением при этом передачи сигнала с помощью IL-21, как описано в данном документе, и, таким образом, считаются применимыми в способах лечения или предупреждения одного или нескольких заболеваний, например, рака. Для целей настоящего изобретения количество или доза вводимого активного средства должны быть достаточными для достижения эффекта, например, терапевтического или профилактического ответа, у субъекта или животного в течение разумного интервала времени. Например, доза активного средства по настоящему изобретению должна быть достаточной для лечения рака, как описано в данном документе, в течение периода от приблизительно 1 до 4 минут, от 1 до 4 часов или от 1 до 4 недель или дольше, например,

от 5 до 20 или больше недель, начиная с момента времени введения. В некоторых вариантах осуществления период времени может быть даже более длинным. Доза будет определяться в соответствии с эффективностью конкретного активного средства и состоянием животного (например, человека), а также массой тела животного (например, человека), подлежащего лечению.

Из уровня техники известно множество анализов для определения вводимой дозы. Для целей данного документа анализ, который включает сравнение степени, в которой рак подвергается лечению после введения млекопитающему указанной дозы активного средства по настоящему изобретению, среди совокупностей млекопитающих, каждой совокупности которых дают отличающуюся дозу активного средства, можно применять для определения начальной дозы, которая должна быть введена млекопитающему. Степень, в которой рак подвергается лечению после введения определенной дозы, может быть представлена, например, в виде цитотоксичности активного средства или степени регрессии опухоли, достигаемой при использовании активного средства в мышинной ксенотрансплантатной модели. Способы измерения цитотоксичности слитых белков и способы анализа регрессии опухоли известны из уровня техники.

Доза активного средства по настоящему изобретению также будет определяться в соответствии с наличием, природой и степенью тяжести каких-либо нежелательных побочных эффектов, которые могут сопутствовать введению конкретного активного средства по настоящему изобретению. Как правило, лечащий врач будет определять дозу активного средства по настоящему изобретению, с использованием которой он будет лечить каждого отдельного пациента, принимая во внимание множество факторов, таких как возраст, масса тела, общее состояние здоровья, рацион, пол, активное средство по настоящему изобретению, которое должно вводиться, путь введения и тяжесть состояния, лечение которого осуществляется. В качестве примера и без намерения ограничить настоящее изобретение, доза активного средства по настоящему изобретению может составлять от приблизительно 0,0001 до приблизительно 1 г/кг массы тела получающего лечение субъекта/день, от приблизительно 0,0001 до приблизительно 0,001 г/кг массы тела/день или от приблизительно 0,01 мг до приблизительно 1 г/кг массы тела/день.

#### *Составы с контролируемым высвобождением*

В некоторых вариантах осуществления активные средства, описанные в данном документе, могут быть модифицированы в виде депо-формы, так, чтобы способ высвобождения активного средства по настоящему изобретению в организме, в который его вводят, контролировался с точки зрения времени и местоположения в организме (см., например, патент США № 4450150). Депо-формы активных средств по настоящему изобретению могут представлять собой, например, имплантируемую композицию, содержащую активные средства и пористый или непористый материал, такой как полимер, где активное средство инкапсулировано в материале или рассредоточено в нем, и/или предусматривающую разложение непористого материала. Депо-форму затем имплантируют в желаемое местоположение в организме субъекта, и активное средство

высвобождается из имплантата с предварительно определенной скоростью.

Фармацевтическая композиция, содержащая активное средство, в определенных аспектах модифицирована так, чтобы она имела любой тип профиля высвобождения *in vivo*. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция представляет собой состав с немедленным высвобождением, контролируемым высвобождением, замедленным высвобождением, пролонгированным высвобождением, отсроченным высвобождением или двухфазным высвобождением. Способы составления пептидов для контролируемого высвобождения известны из уровня техники. См., например, Qian et al., *J Pharm* 374: 46-52 (2009) и публикации международных заявок на патент №№ WO 2008/130158, WO2004/033036; WO2000/032218 и WO 1999/040942.

Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать, например, мицеллы или липосомы или некоторую другую инкапсулированную форму или могут вводиться в форме с пролонгированным высвобождением для обеспечения эффекта длительного хранения и/или доставки.

#### *Комбинации*

В некоторых вариантах осуществления слитые белки или антигенсвязывающие белки (например, антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1), описанные в данном документе, вводят отдельно и, в альтернативных вариантах осуществления, вводят в комбинации с другим терапевтическим средством, например, другим активным средством по настоящему изобретению другого типа (например, структуры). В некоторых аспектах другое терапевтическое средство направлено на лечение или предупреждение рака. В некоторых вариантах осуществления другое терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления другое терапевтическое средство представляет собой средство, применяемое в лучевой терапии для лечения рака. Соответственно, в некоторых аспектах слитые белки или антигенсвязывающие белки (например, антитело к PD-1, его антигенсвязывающий фрагмент антитела или белковый продукт на основе антитела к PD-1), описанные в данном документе, вводят в комбинации с одним или несколькими координационными соединениями платины, ингибиторами топоизомераз, антибиотиками, антимиотическими алкалоидами и дифторнуклеозидами. В иллюстративных аспектах слитый белок на основе IL-21, описанный в данном документе (например, антитело к PD-1, слитое с мутеином IL-21), применяют в комбинации с антигенсвязывающим белком (например, антителом к PD-1, его антигенсвязывающим фрагментом антитела или белковым продуктом на основе антитела к PD-1).

В конкретных вариантах осуществления любое из антител 20A2, 20C1, 22D4, 20C1.006, 20C1.009, 20A2.003, 22D4.006, 22D4.017 вводят в комбинации со слитым белком на основе IL-21, описанным в данном документе, в том числе, например, слитым белком, содержащим гомодимер или мономер, выбранный из:

гомодимера, содержащего две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит







антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 514, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 559);

мономера, содержащего две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 515, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 560);

мономера, содержащего две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 516, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 558);

мономера, содержащего две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 517, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 559); или

мономера, содержащего две легкие цепи антитела (каждая из которых содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 371) и две различные тяжелые цепи антитела (одна из которых слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 518, и одна из которых не слита с мутеином IL-21 и содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 560).

### *Наборы*

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены наборы, содержащие мутеин IL-21, антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антитело к PD-1), конъюгат, слитый белок, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина по настоящему изобретению или их комбинацию. В иллюстративных аспектах набор содержит по меньшей мере один мутеин IL-21, антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антитело к PD-1), конъюгат, слитый белок, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина по настоящему изобретению или их комбинацию в контейнере. В иллюстративных аспектах по меньшей мере один мутеин IL-21, антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антитело к PD-1), конъюгат, слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или клетка-хозяин по настоящему изобретению предусмотрены в наборе в виде однократной дозы. Для целей данного документа "однократная доза" относится к дискретному количеству, диспергированному в подходящем носителе. В иллюстративных аспектах однократная доза представляет собой количество, достаточное для обеспечения у субъекта желаемого эффекта, например, лечения рака. В иллюстративных аспектах набор содержит несколько однократных доз, например, недельный или месячный запас однократных доз, при этом необязательно каждая из которых упакована по отдельности или иным образом отделена от

других однократных доз. В некоторых вариантах осуществления компоненты набора/разовой дозы упакованы вместе с инструкцией по введению пациенту. В некоторых вариантах осуществления набор содержит одно или несколько устройств для введения пациенту, например, иглу и шприц и т. п. В некоторых аспектах по меньшей мере один мутеин IL-21, антигенсвязывающий белок для PD-1 (например, антитело к PD-1), конъюгат, слитый белок, нуклеиновая кислота, вектор или клетка-хозяин по настоящему изобретению или их комбинация предварительно упакованы в готовой к применению форме, например, шприце, пакете для внутривенного введения и т. д. В иллюстративных аспектах готовая к применению форма предназначена для однократного применения. В иллюстративных аспектах набор содержит несколько готовых к применению форм для однократного применения по меньшей мере одного мутеина IL-21, антигенсвязывающего белка для PD-1 (например, антитела к PD-1), конъюгата, слитого белка, нуклеиновой кислоты, вектора или клетки-хозяина по настоящему изобретению. В некоторых аспектах набор дополнительно содержит другие терапевтические или диагностические средства или фармацевтически приемлемые носители (например, растворители, буферы, разбавители и т. д.), в том числе любые из описанных в данном документе.

#### *Способы изготовления*

Мутеины IL-21 по настоящему изобретению можно получать с помощью способов, известных из уровня техники. Подходящие способы синтеза полипептидов *de novo* описаны, например, в Chan et al., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2005; *Peptide and Protein Drug Analysis*, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; *Epitope Mapping*, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; и патенте США № 5449752. Дополнительные иллюстративные способы получения пептидов по настоящему изобретению изложены в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления мутеины IL-21, описанные в данном документе, коммерчески синтезируются такими компаниями, как Synper (Дублин, Калифорния), Peptide Technologies Corp. (Гейтерсберг, Мэриленд), Multiple Peptide Systems (Сан-Диего, Калифорния), Peptide 2.0 Inc. (Шантильи, Вирджиния) и American Peptide Co. (Саннивейл, Калифорния). В данном отношении мутеины IL-21 могут быть синтетическими, рекомбинантными, выделенными и/или очищенными.

Также в некоторых аспектах мутеины IL-21 получают рекомбинантным путем с использованием нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность пептида, с применением стандартных рекомбинантных способов. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994.

Способы получения мутеина IL-21 предусмотрены в данном документе. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению с обеспечением экспрессии мутеина IL-21 и сбор экспрессирующегося мутеина IL-21.

Способы получения слитого белка, содержащего мутеин IL-21, также предусмотрены в данном документе. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению с обеспечением экспрессии слитого белка и сбор экспрессирующегося слитого белка.

В иллюстративных вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую мутеин IL-21 или слитый белок, описанные в данном документе, в целях обеспечения экспрессии мутеина IL-21 или слитого белка. Клетка-хозяин может представлять собой любую из клеток-хозяев, описанных в данном документе. В иллюстративных аспектах клетка-хозяин выбрана из группы, состоящей из клеток CHO, клеток NS0, клеток COS, клеток VERO и клеток BHK. В иллюстративных аспектах стадия культивирования клетки-хозяина включает культивирование клетки-хозяина в среде для роста для поддержания роста и размножения клетки-хозяина. В иллюстративных аспектах среда для роста обеспечивает своевременное увеличение плотности клеток, жизнеспособности и продуктивности культуры. В иллюстративных аспектах среда для роста содержит аминокислоты, витамины, неорганические соли, глюкозу и сыворотку крови в качестве источника факторов роста, гормонов и факторов прикрепления. В иллюстративных аспектах среда для роста представляет собой среду с полностью химически определенным составом, состоящую из аминокислот, витаминов, следовых элементов, неорганических солей, липидов и инсулина или инсулиноподобных факторов роста. В дополнение к питательным веществам, среда для роста также способствует поддержанию pH и осмоляльности. Несколько сред для роста являются коммерчески доступными и описаны в уровне техники. См., например, Aroga, "Cell Culture Media: A Review" *MATER METHODS* 3:175 (2013).

В иллюстративных аспектах способ получения мутеина IL-21 или слитого белка по настоящему изобретению включает культивирование клетки-хозяина в питательной среде. В иллюстративных аспектах способ включает культивирование в питательной среде в периодическом режиме с подпиткой. Способы получения рекомбинантных белков известны из уровня техники. См., например, Li et al., "Cell culture processes for monoclonal antibody production" *MAbs* 2(5): 466-477 (2010).

Способ получения мутеина IL-21 или слитого белка может включать одну или несколько стадий очистки мутеина или белка из культуры клеток или ее надосадочной жидкости и предпочтительно извлечение очищенного белка. В иллюстративных аспектах способ включает одну или несколько стадий осуществления хроматографии, например, аффинной хроматографии (например, аффинной хроматографии с белком А), ионообменной хроматографии, хроматографии гидрофобных взаимодействий. В иллюстративных аспектах способ включает очистку белка с помощью смолы для аффинной хроматографии с белком А.

В иллюстративных вариантах осуществления способ дополнительно включает стадии составления очищенного белка и т. д. с получением таким образом состава, содержащего очищенный белок. Такие стадии описаны в Formulation and Process

Development Strategies for Manufacturing, eds. Jameel и Hershenson, John Wiley & Sons, Inc. (Hoboken, NJ), 2010.

### *Способы применения*

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены способы лечения. В иллюстративных вариантах осуществления способ представляет собой способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по настоящему изобретению в количестве, эффективном для лечения субъекта.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению являются применимыми для ингибирования передачи сигнала с помощью PD-1 и/или активации передачи сигнала с помощью IL-21. Без ограничения конкретной теорией, [1] активность ингибирования PD-1 с помощью композиций, предусмотренных в данном документе, позволяет таким объектам быть применимыми в способах усиления Т-клеточной активности и усиления иммунного ответа и, в частности, иммунного ответа против опухоли или рака; и/или [2] активность активации IL-21 с помощью композиций, предусмотренных в данном документе, позволяет таким объектам увеличивать выживаемость и эффекторную функцию Т-клеток, ограничивать терминальную дифференцировку и утрату репликативного потенциала, способствовать продолжительному существованию Т-клеток путем сдвига фенотипа активированных эффекторных клеток в сторону менее обученных Т-клеток (например, путем усиления экспрессии CCR7) и усиливать цитотоксичность в отношении клетки-мишени (например, раковой клетки) (например, путем увеличения продуцирования IFN $\gamma$  и гранзима В).

Соответственно, в данном документе предусмотрены способы усиления Т-клеточной активности у субъекта, увеличения выживаемости и эффекторной функции Т-клеток, ограничения терминальной дифференцировки и утраты репликативного потенциала, способствования продолжительному существованию Т-клеток и усиления цитотоксичности в отношении клеток-мишеней (например, раковых клеток). В иллюстративных вариантах осуществления способы включают введение субъекту фармацевтической композиции по настоящему изобретению в эффективном количестве. В иллюстративных аспектах Т-клеточная активность или иммунный ответ направлены против раковой клетки, или раковой ткани, или опухолевой клетки, или опухоли. В иллюстративных аспектах иммунный ответ представляет собой гуморальный иммунный ответ. В иллюстративных аспектах иммунный ответ представляет собой врожденный иммунный ответ. В иллюстративных аспектах усиленный иммунный ответ представляет собой иммунный ответ, опосредованный Т-клетками.

Используемый в данном документе термин "усиливать" и слова, происходящие от него, могут не означать 100% или полное усиление или увеличение. Они скорее означают различные степени усиления, которые средний специалист в данной области признает в качестве обладающих потенциальной пользой или терапевтическим эффектом. В данном отношении фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут усиливать,

например, Т-клеточную активность или усиливать иммунный ответ до любой величины или уровня. В иллюстративных вариантах осуществления усиление, предусмотренное способами по настоящему изобретению, представляет собой по меньшей мере или приблизительно 10% усиление (например, по меньшей мере или приблизительно 20% усиление, по меньшей мере или приблизительно 30% усиление, по меньшей мере или приблизительно 40% усиление, по меньшей мере или приблизительно 50% усиление, по меньшей мере или приблизительно 60% усиление, по меньшей мере или приблизительно 70% усиление, по меньшей мере или приблизительно 80% усиление, по меньшей мере или приблизительно 90% усиление, по меньшей мере или приблизительно 95% усиление, по меньшей мере или приблизительно 98% усиление).

Способы измерения Т-клеточной активности и иммунных ответов известны из уровня техники. Т-клеточную активность можно измерить с помощью, например, анализа цитотоксичности, такого как описанный в Fu et al., PLoS ONE 5(7): e11867 (2010). Другие анализы Т-клеточной активности описаны в Bercovici et al., Clin Diagn Lab Immunol. 7(6): 859-864 (2000). Способы измерения иммунных ответов описаны, например, в Macatangay et al., Clin Vaccine Immunol 17(9): 1452-1459 (2010), и Clay et al., Clin Cancer Res. 7(5): 1127-35 (2001).

Дополнительно в данном документе предусмотрены способы лечения субъекта с раком и способы лечения субъекта с солидной опухолью. В иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение субъекту фармацевтической композиции по настоящему изобретению в количестве, эффективном для лечения рака или солидной опухоли у субъекта. Рак, поддающийся лечению с помощью способов, раскрытых в данном документе, может представлять собой любую форму рака, например, любой злокачественный рост или опухоль, обусловленные аномальным и неконтролируемым делением клеток, которые могут распространяться в другие части тела посредством лимфатической системы или кровотока. В некоторых аспектах рак представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из острого лимфоцитарного рака, острого миелоидного лейкоза, альвеолярной рабдомиосаркомы, рака кости, рака головного мозга, рака молочной железы, рака анального отверстия, рака заднепроходного канала или аноректального рака, рака глаза, рака внутripеченочного желчного протока, рака суставов, рака шеи, желчного пузыря или плевры, рака носа, носовой полости или среднего уха, рака ротовой полости, рака вульвы, хронического лимфоцитарного лейкоза, хронического миелоидного рака, рака толстой кишки, рака пищевода, рака шейки матки, карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта, лимфомы Ходжкина, рака гортанной части глотки, рака почки, рака гортани, рака печени, рака легкого, злокачественной мезотелиомы, меланомы, множественной миеломы, рака носоглотки, неходжкинской лимфомы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака брюшины, сальника и брыжейки, рака глотки, рака предстательной железы, рака прямой кишки, рака почки (например, почечноклеточной карциномы (RCC)), рака тонкой кишки, рака мягких тканей, рака желудка, рака яичка, рака щитовидной железы, рака мочеочника и рака мочевого пузыря. В конкретных аспектах рак

выбран из группы, состоящей из форм рака головы и шеи, яичника, шейки матки, мочевого пузыря и пищевода, рака поджелудочной железы, желудочно-кишечного тракта, форм рака желудка, молочной железы, эндометрия и колоректального рака, гепатоцеллюлярной карциномы, глиобластомы, рака мочевого пузыря, рака легкого, например, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), бронхиолоальвеолярной карциномы. В конкретных вариантах осуществления опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак головы и шеи, рак почки, трижды негативный рак молочной железы и рак желудка. В иллюстративных аспектах субъект имеет опухоль (например, солидную опухоль, гемобластоз или лимфолейкоз), и фармацевтическую композицию вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения опухоли у субъекта. В других иллюстративных аспектах опухоль представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), мелкоклеточный рак легкого (SCLC), рак головы и шеи, рак почки, рак молочной железы, меланому, рак яичника, рак печени, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, рак предстательной железы, рак желудка, лимфому или лейкоз, и фармацевтическую композицию вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения опухоли у субъекта.

Используемый в данном документе термин "лечить", а также слова, родственные ему, не обязательно подразумевают 100% или полное лечение. Они скорее означают различные степени лечения, которые средний специалист в данной области признает в качестве обладающих потенциальной пользой или терапевтическим эффектом. В данном отношении способы лечения рака по настоящему изобретению могут обеспечивать любую величину или любой уровень лечения. Кроме того, лечение, предусмотренное способом по настоящему изобретению, может включать лечение одного или нескольких состояний или симптомов или признаков рака, подвергаемого лечению. Также лечение, предусмотренное способами по настоящему изобретению, может охватывать замедление прогрессирования рака. Например, способы могут обеспечивать лечение рака благодаря усилению Т-клеточной активности или иммунного ответа на рак, уменьшению роста опухоли или рака, уменьшению метастазирования опухолевых клеток, увеличению гибели клеток опухоли или раковых клеток и т. п. В иллюстративных аспектах способы обеспечивают лечение посредством задержки начала проявления или рецидива рака на 1 день, 2 дня, 4 дня, 6 дней, 8 дней, 10 дней, 15 дней, 30 дней, два месяца, 4 месяцев, 6 месяцев, 1 год, 2 года, 4 года или больше. В иллюстративных аспектах способы обеспечивают лечение посредством увеличения выживаемости субъекта.

### *Субъекты*

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъект является млекопитающим, включающим без ограничения млекопитающих из отряда Rodentia, таких как мыши и хомяки, и млекопитающих из отряда Lagomorpha, таких как кролики, млекопитающих из отряда Carnivora, в том числе кошачьих (кошек) и псовых (собак), млекопитающих из отряда Artiodactyla, в том числе бычьих (коров) и свиных (свиней), или отряда Perissodactyla, в том числе лошадиных (лошадей). В некоторых аспектах

млекопитающие относятся к отряду Приматы, Цепкохвостые обезьяны или Обезьянообразные (нечеловекообразные обезьяны) или к отряду Человекообразные (люди и человекообразные обезьяны). В некоторых аспектах млекопитающее является человеком.

*Иллюстративные варианты осуществления*

В иллюстративных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен мутеин IL-21, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2,

QGQDX HMXXM XXXXX XVDXL KNXVN DLVPE FLPAP EDVET NCEWS AFSCF QKAQL KSANT GNNEX XIXXX XXXLX XXXXX TNAGR RQKHR LTCPS CDSYE KKPPK EFLXX FXXLL XXMXX QHXSS RTHGS EDS (SEQ ID NO: 2), где "X" представляет собой любую аминокислоту, и где аминокислотная последовательность мутеина IL-21 отличается от аминокислотной последовательности IL-21 человека (SEQ ID NO: 1) по меньшей мере 1 аминокислотой.

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности IL-21 человека (SEQ ID NO: 1) не более чем 7 аминокислотами. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности IL-21 человека (SEQ ID NO: 1) 3, 4, 5 или 6 аминокислотами. В иллюстративных примерах мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности IL-21 человека (SEQ ID NO: 1) 1 или 2 аминокислотами. В иллюстративных аспектах отличие(отличия) между аминокислотной последовательностью мутеина IL-21 и аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1 находится/находятся в пределах аминокислот 10-15 включительно или аминокислот 105-123 включительно в SEQ ID NO: 2, где отличие(отличия) необязательно имеет(имеют) место по аминокислотам 11, 14, 15, 109, 110, 112, 113, 116, 119, 120 и/или 123 в SEQ ID NO: 2. В иллюстративных аспектах отличие(отличия) между аминокислотной последовательностью мутеина IL-21 и аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1 находится/находятся в пределах аминокислот 5-25 включительно или аминокислот 65-80 включительно в SEQ ID NO: 2, где отличие(отличия) необязательно имеет(имеют) место по аминокислотам 5, 8, 9, 12, 13, 16, 19, 23, 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, и/или 80 в SEQ ID NO: 2.

В некоторых аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность с одной аминокислотной заменой по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых случаях аминокислотная замена имеет место в положении 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 109, 110, 112, 113, 116, 117, 119, 120 или 123 в SEQ ID NO: 1. В иллюстративных аспектах аминокислотная замена имеет место в положении 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 65, 66, 68, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 109, 110, 112, 113, 116, 117, 119, 120 или 123 в SEQ ID NO: 1. В иллюстративных примерах мутеин IL-21 содержит аминокислотную замену:

а. в положении 5, 8, 9, 12, 14, 15, 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 80, 116, или 119 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является алифатической аминокислотой;

б. в положении 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 110, 112, 116, 117, 119, 120, или 123 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является кислой аминокислотой;

с. в положении 5, 9, 73, 76, 109, 113 или 116 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является основной аминокислотой;

д. в положении 5, 8, 9, 70 или 76 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является ароматической аминокислотой;

е. в положении 5, 8, 9, 12, 15, 73, 76, 116 или 119 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является аминокислотой, содержащей амидную группу в боковой цепи;

ф. в положении 5, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 73, 76, 116 или 119 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является неароматической аминокислотой, содержащей гидроксильную группу в боковой цепи;

г. в положении 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77 или 80 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является иминокислотой;

h. в положении 5, 9, 15, 76, 116 или 119 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является аминокислотой, содержащей серосодержащую боковую цепь; или

i. или в их комбинации.

В иллюстративных аспектах заменяющая аминокислота является встречающейся в природе аминокислотой. В некоторых случаях мутеин IL-21 содержит аминокислотную замену аминокислотой в положении в соответствии с таблицей А. Таблица А показана ниже.

ТАБЛИЦА А

| Аминокислотное положение в SEQ ID NO: 1 | Аминокислота (в виде однобуквенного кода)       | Аминокислотное положение в SEQ ID NO: 1 | Аминокислота (в виде однобуквенного кода)          |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 5                                       | A, D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, или Y | 72                                      | D, G, или P                                        |
| 8                                       | A, D, E, N, S, T, V, или Y                      | 73                                      | A, D, E, G, H, I, N, P, Q, S, или V                |
| 9                                       | A, D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, или Y | 75                                      | D, G, или P                                        |
| 11                                      | D или S                                         | 76                                      | A, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, или Y |
| 12                                      | A, D, E, N, S, T, или V                         | 77                                      | D, G, или P                                        |
| 13                                      | D                                               | 78                                      | D                                                  |



|    |                                  |     |                                        |
|----|----------------------------------|-----|----------------------------------------|
| 14 | A, D, или S                      | 79  | D                                      |
| 15 | A, E, I, M, N, Q, S, T,<br>или V | 80  | G, или P                               |
| 16 | D или E                          | 109 | K                                      |
| 19 | D                                | 110 | D                                      |
| 23 | D                                | 112 | D                                      |
| 65 | D, G, или P                      | 113 | K                                      |
| 66 | D, G, или P                      | 116 | A, D, E, I, K, L, M, N,<br>S, T, или V |
| 68 | Q                                | 117 | D                                      |
| 69 | D, G, или P                      | 119 | A, D, E, M, N, Q, S,<br>или T          |
| 70 | E, G, P, или Y                   | 120 | D                                      |
| 71 | L                                | 123 | D                                      |

В иллюстративных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен мутеин IL-21, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 3-21, 23-56, 58-112, 114-208, 210-222, 224-255 и 283.

В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную последовательность с двумя аминокислотными заменами по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 человека (SEQ ID NO: 1). В иллюстративных аспектах аминокислотная замена имеет место в двух из положений 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 109, 110, 112, 113, 116, 117, 119, 120, или 123 в SEQ ID NO: 1. В иллюстративных примерах аминокислотные замены имеют место в двух из положений 5, 9, 15, 70, 71, 72, 73, и 76 в SEQ ID NO: 1. Аминокислотные замены необязательно имеют место в двух из положений 5, 9, 73 и 76 в SEQ ID NO: 1. В некоторых аспектах одна из замен имеет место в положении 76 в SEQ ID NO: 1. В иллюстративных примерах заменяющая аминокислота в положении 76 в SEQ ID NO: 1 является алифатической аминокислотой или кислой аминокислотой. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную замену в положении 5, 9 или 73 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая аминокислота является алифатической аминокислотой или кислой аминокислотой. В некоторых аспектах мутеин IL-21 содержит аминокислотную замену в положении 5 в SEQ ID NO: 1, и заменяющая аминокислота является аминокислотой с амидной группой в боковой цепи. В некоторых случаях алифатическая аминокислота представляет собой аланин, кислая аминокислота представляет собой глутаминовую кислоту, или аминокислота с амидной группой в боковой цепи представляет собой глутамин. В настоящем изобретении в иллюстративных вариантах осуществления предусмотрен мутеин IL-21, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 208, 210-222, 224-248 и 255.

Что касается любого из вышеуказанных аспектов, мутеин IL-21 может связываться с рецептором IL-21 со сниженной аффинностью по сравнению с аффинностью IL-21 дикого типа к рецептору IL-21. В некоторых аспектах рецептор IL-21 имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 256 или 261. В некоторых случаях мутеин IL-21 связывается с гамма-цепью рецептора IL-21, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 257. В иллюстративных примерах мутеин IL-21 по настоящему изобретению связывается с рецептором IL-21 человека с  $K_d$ , которая превышает или равняется приблизительно 0,04 нМ.

Дополнительно предусмотрены конъюгаты. В иллюстративных аспектах конъюгат содержит мутеин IL-21 согласно любому из предыдущих абзацев и гетерологичный фрагмент. В иллюстративных примерах IL-21 непосредственно присоединен к гетерологичному фрагменту. В альтернативных примерах IL-21 присоединен к гетерологичному фрагменту посредством линкера. В некоторых аспектах линкер включает в себя пептид, например, содержащий аминокислотную последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 262). В иллюстративных аспектах гетерологичный фрагмент представляет собой полипептид, где полипептид необязательно представляет собой антигенсвязывающий белок. В некоторых случаях гетерологичный полипептид представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент антитела. В иллюстративных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к PD-1. В некоторых аспектах мутеин IL-21 непосредственно присоединен к Fc антитела. В иллюстративных аспектах мутеин IL-21 присоединен к Fc антитела посредством линкера. В некоторых аспектах конъюгат содержит один мутеин IL-21, где указанный один мутеин IL-21 связан с С-концом одной из двух тяжелых цепей антитела. В иллюстративных примерах конъюгат содержит два мутеина IL-21, где первый мутеин IL-21 связан с С-концом первой тяжелой цепи антитела, и второй мутеин IL-21 связан с С-концом второй тяжелой цепи антитела. Первый IL-21 необязательно имеет ту же аминокислотную последовательность, что и второй мутеин IL-21. В качестве альтернативы, первый IL-21 имеет отличающуюся аминокислотную последовательность по сравнению со вторым мутеином IL-21. В иллюстративных аспектах тяжелые цепи антитела содержат мутации с заменой пар заряженных аминокислот (например, мутации V1, V4, V103 или V131). В иллюстративных аспектах конъюгата согласно любому из предыдущих абзацев мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены в двух из положений 5, 9, 73 и 76 в SEQ ID NO: 1. В иллюстративных аспектах конъюгат содержит мутеин IL-21, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, если не считать того, что указанный мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены в любых двух из положений 5, 9, 73 и 76 в SEQ ID NO: 1, и антитело к PD-1, где мутеин IL-21 связан с С-концом антитела к PD-1. В иллюстративных аспектах конъюгат содержит антитело к PD-1, содержащее (а) аминокислотную последовательность области 1, определяющей комплементарность (CDR), тяжелой цепи (HC), приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372 и 382, или

последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373 и 383, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (c) аминокислотную последовательность CDR3 HC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374 и 384, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (d) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC), приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375 и 385, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (e) аминокислотную последовательность CDR2 LC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376 и 386, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (f) аминокислотную последовательность CDR3 LC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377 и 387, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; или (g) комбинацию любых двух или более из (a)-(f). В иллюстративных примерах антитело к PD-1 содержит шесть аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO: 312-317; (b) SEQ ID NO: 322-327; (c) SEQ ID NO: 332-337; (d) SEQ ID NO: 342-347; (e) SEQ ID NO: 352-357; (f) SEQ ID NO: 362-367; (g) SEQ ID NO: 372-377 и (h) SEQ ID NO: 382-387. В некоторых аспектах антитело к PD-1 содержит пару аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO: 318 и 319; (b) SEQ ID NO: 328 и 329; (c) SEQ ID NO: 338 и 339; (d) SEQ ID NO: 348 и 349; (e) SEQ ID NO: 358 и 359; (f) SEQ ID NO: 368 и 369; (g) SEQ ID NO: 378 и 379 и (h) SEQ ID NO: 388 и 389. В иллюстративных аспектах антитело к PD-1 содержит константную область, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 265-267, 282, 284-311. В определенных случаях антитело к PD-1 содержит пару аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO: 320 и 321; (b)

SEQ ID NO: 330 и 331; (c) SEQ ID NO: 340 и 341; (d) SEQ ID NO: 350 и 351; (e) SEQ ID NO: 360 и 361; (f) SEQ ID NO: 370 и 371; (g) SEQ ID NO: 380 и 381 и (h) SEQ ID NO: 390 и 391.

В иллюстративных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен слитый полипептид или слитый белок, содержащий мутеин IL-21, описанный в данном документе, и гетерологичный полипептид или пептид. В некоторых аспектах слитый полипептид или слитый белок содержит иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент антитела. В иллюстративных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую мутеин IL-21, описанный в данном документе. В иллюстративных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, описанную в данном документе. В иллюстративных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту или вектор, описанные в данном документе. В иллюстративных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен набор, содержащий мутеин IL-21, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку-хозяина, конъюгат, слитый белок или их комбинацию, описанные в данном документе, и контейнер.

Дополнительно предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие мутеин IL-21, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку-хозяина, конъюгат, слитый белок или их комбинацию по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

Также предусмотрены способы получения мутеина IL-21, включающие культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в целях обеспечения экспрессии мутеина IL-21 и сбор экспрессирующегося мутеина IL-21. Дополнительно предусмотрен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом. Способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по настоящему изобретению в количестве, эффективном для лечения субъекта. В иллюстративных аспектах субъект имеет солидную опухоль, и фармацевтическую композицию вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения солидной опухоли у субъекта. Солидная опухоль необязательно выбрана из группы, состоящей из форм рака головы и шеи, яичника, шейки матки, мочевого пузыря и пищевода, рака поджелудочной железы, желудочно-кишечного тракта, форм рака желудка, молочной железы, эндометрия и колоректального рака, гепатоцеллюлярной карциномы, глиобластомы, рака мочевого пузыря, рака легкого, например, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), бронхиолоальвеолярной карциномы.

В иллюстративных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен антигенсвязывающий белок для PD-1, содержащий (а) аминокислотную последовательность области 1, определяющей комплементарность (CDR), тяжелой цепи (HC), приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 312, 322, 332, 342, 352, 362, 372 и 382, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью

последовательности; (b) аминокислотную последовательность CDR2 HC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 313, 323, 333, 343, 353, 363, 373 и 383, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (c) аминокислотную последовательность CDR3 HC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 314, 324, 334, 344, 354, 364, 374 и 384, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (d) аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи (LC), приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из 315, 325, 335, 345, 355, 365, 375 и 385, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (e) аминокислотную последовательность CDR2 LC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из 316, 326, 336, 346, 356, 366, 376 и 386, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; (f) аминокислотную последовательность CDR3 LC, приведенную в таблице D, или последовательность, выбранную из группы, состоящей из 317, 327, 337, 347, 357, 367, 377 и 387, или последовательность, вариантную по отношению к ней, которая отличается только одной или двумя аминокислотами или которая характеризуется по меньшей мере или приблизительно 70% идентичностью последовательности; или (g) комбинацию любых двух или более из (a)-(f). В иллюстративных примерах антигенсвязывающий белок для PD-1 содержит шесть аминокислотных последовательностей CDR, выбранных из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO: 312-317; (b) SEQ ID NO: 322-327; (c) SEQ ID NO: 332-337; (d) SEQ ID NO: 342-347; (e) SEQ ID NO: 352-357; (f) SEQ ID NO: 362-367; (g) SEQ ID NO: 372-377 и (h) SEQ ID NO: 382-387. В определенных аспектах антигенсвязывающий белок для PD-1 содержит пару аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO: 318 и 319; (b) SEQ ID NO: 328 и 329; (c) SEQ ID NO: 338 и 339; (d) SEQ ID NO: 348 и 349; (e) SEQ ID NO: 358 и 359; (f) SEQ ID NO: 368 и 369; (g) SEQ ID NO: 378 и 379 и (h) SEQ ID NO: 388 и 389. В иллюстративных примерах антигенсвязывающий белок для PD-1 содержит константную область, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 265-267, 282, 284-311. В некоторых аспектах антигенсвязывающий белок для PD-1 содержит пару аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO: 320 и 321; (b) SEQ ID NO: 330 и 331; (c) SEQ ID NO: 340 и 341; (d) SEQ ID NO: 350 и 351; (e) SEQ ID NO: 360 и 361; (f) SEQ ID NO: 370 и 371; (g) SEQ ID NO: 380 и 381 и (h) SEQ ID NO: 390 и 391.

В иллюстративных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен конъюгат, содержащий антигенсвязывающий белок для PD-1, описанный в предыдущих абзацах, и гетерологичный фрагмент. В иллюстративных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен слитый полипептид или слитый белок, содержащий антигенсвязывающий белок для PD-1, описанный в предыдущих абзацах, и гетерологичный полипептид или пептид. В иллюстративных вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок для PD-1, конъюгат, или слитый полипептид, или слитый белок, описанный в предыдущих абзацах. В иллюстративных примерах нуклеиновая кислота содержит последовательность под любым из SEQ ID NO: 392-471. В настоящем изобретении в иллюстративных вариантах осуществления предусмотрены вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, описанную выше, а также клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту или вектор, описанные выше. Также предусмотрен набор, содержащий антигенсвязывающий белок для PD-1, описанный в предыдущих абзацах, или конъюгат, слитый полипептид, слитый белок, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина или их комбинацию, и контейнер. В настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, которая в иллюстративных вариантах осуществления содержит антигенсвязывающий белок для PD-1, описанный в предыдущих абзацах, или конъюгат, слитый полипептид, слитый белок, нуклеиновую кислоту, вектор или клетку-хозяина или их комбинацию и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ получения антигенсвязывающего белка для PD-1, где в иллюстративных вариантах осуществления способ включает культивирование клетки-хозяина, описанной в данном абзаце, в целях обеспечения экспрессии антигенсвязывающего белка для PD-1 и сбор экспрессирующегося антигенсвязывающего белка для PD-1. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, где в иллюстративных вариантах осуществления способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, описанной в данном абзаце, в количестве, эффективном для лечения субъекта. В иллюстративных аспектах субъект имеет солидную опухоль, и фармацевтическую композицию вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения солидной опухоли у субъекта. Салидная опухоль необязательно выбрана из группы, состоящей из форм рака головы и шеи, яичника, шейки матки, мочевого пузыря и пищевода, рака поджелудочной железы, желудочно-кишечного тракта, форм рака желудка, молочной железы, эндометрия и колоректального рака, гепатоцеллюлярной карциномы, глиобластомы, рака мочевого пузыря, рака легкого, например, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), бронхиолоальвеолярной карциномы.

Следующие примеры представлены лишь для иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивают каким-либо образом его объем.

## **ПРИМЕРЫ**

### ПРИМЕР 1

В данном примере продемонстрировано, что комбинированная терапия, предусматривающая блокирующее антитело к PD-1 и рекомбинантный IL-21, является преимущественной по сравнению с соответствующей монотерапией.

В доклиническом исследовании эффекты комбинированного лечения с помощью моноклонального блокирующего антитела к PD-1 и рекомбинантного мышинового IL-21 (gmIL-21) сравнивали с эффектами лечения, представляющего собой монотерапию с помощью либо блокирующего антитела к PD-1, либо gmIL-21.

В день 1 клетки карциномы толстой кишки линии CT26/3E5 имплантировали мышам линии BALB/c для инициации роста опухоли. В день 12 измеряли опухоли и мышей рандомизировали на 4 группы (10 мышей на группу): группа 1 получала внутрибрюшинную (IP) инъекцию 300 мкг антитела изотипического контроля (mIgG1), группа 2 получала IP инъекцию 300 мкг блокирующего антитела к PD-1, группа 3 получала 50 мкг gmIL-21, и группа 4 получала оба из блокирующего антитела к PD-1 (300 мкг) и gmIL-21 (50 мкг). Группы 1, 2 и 4 получали антитела один раз каждые 3 дня, а группы 3 и 4 получали gmIL-21 3 раза в неделю в течение 3 недель. Введение доз завершали в день 33.

Объем опухоли отслеживали на протяжении всего исследования. Как показано на фигурах 1A-1D, размер опухоли увеличился в наибольшей степени в группе 1 и в наименьшей степени в группе 4.

Выживаемость, измеренная с помощью анализа Каплана-Мейера с применением логарифмического рангового критерия Мантеля-Кокса, представляла собой основную конечную точку в данном исследовании. Как показано на фигуре 2 и в таблице 1, процент выживаемости и медиана выживаемости были наибольшими в группе 4. Примечательно, что в группе 4 у двух субъектов не было опухолей (таблица 1).

ТАБЛИЦА 1

| Группа | Медиана выживаемости<br>(дни) | Субъекты без опухоли |
|--------|-------------------------------|----------------------|
| 1      | 25                            | 0                    |
| 2      | 29                            | 0                    |
| 3      | 27                            | 0                    |
| 4      | 37,5                          | 2                    |

Такие результаты демонстрируют, что комбинация моноклонального блокирующего антитела к PD-1 и рекомбинантного mIL-21 обеспечивает значительное преимущество в отношении выживаемости по сравнению с любым компонентом, вводимым отдельно в качестве монотерапии.

### ПРИМЕР 2

В данном примере продемонстрирована разработка и конструирование нескольких платформ, нацеленных на обеспечение комбинации ингибирования PD-1 и передачи сигнала с помощью IL-21.

Результаты, полученные в примере 1, демонстрируют преимущества подхода, предусматривающего комбинирование передачи сигнала с помощью IL-21 и ингибирования PD-1, для лечения субъектов с опухолями. Однако требовалось тщательное изучение способа доставки IL-21, ввиду способности IL-21 как усиливать ответы Т-клеток CD8, так и подавлять презентацию антигена и примирование Т-клеток. Кроме того, IL-21R широко экспрессируется в тканях человека (например, антигенпрезентирующими клетками (APC), NK-, В- и Т-клетками), что требует тщательного изучения во избежание побочных эффектов (например, активности IL-21 за пределами опухолевого окружения) и клиренса IL-21, поскольку он связывает свой рецептор в различных тканях.

Разработали двусторонний подход для решения вышеуказанных вопросов. Во-первых, были получены мутеины IL-21 с ослабленной активностью, где ослабленная активность обеспечивалась благодаря снижению уровня связывания мутеинов IL-21 с IL-21R. Предполагалось, что такие мутеины IL-21 будут характеризоваться пониженной активностью при распространении по всему организму, но такая активность будет "восстанавливаться" при концентрировании мутеинов IL-21 в Т-клетках-мишенях (например, раковых). То есть мутеины IL-21, если они присутствуют и концентрируются в клетках-мишенях, будут в совокупности проявлять терапевтическую активность IL-21. Во-вторых, мутеины IL-21 подвергали слиянию с нацеливающим плечом, таким как моноклональное антитело, для нацеливания мутеинов IL-21 на соответствующие клетки (например, раковые клетки). С целью доставить мутеины IL-21 к раковой клетке-мишени, их подвергали слиянию с антителом mAb к PD-1. Применение антитела mAb к PD-1 имело дополнительное преимущество, состоящее в предотвращении передачи сигнала посредством PD-1/PD-L1 (таким образом, действуя в качестве ингибитора контрольной точки).

Без ограничения какой-либо конкретной теорией было выдвинуто предположение, что слитый белок, содержащий антитело к PD-1, слитое с мутеином IL-21, обеспечит более долговременный ответ в отношении клеток, являющихся мишенью для разрушения. Например, [1] CD8<sup>+</sup> Т-клетки, экспрессирующие PD-1, будут связываться с помощью антитела mAb к PD-1 слитого белка, и [2] одновременное связывание мутеина IL-21 слитого белка с рецептором IL-21, экспрессируемым CD8<sup>+</sup> Т-клетками, приведет к увеличению уровня пролиферации Т-клеток, а также к большей выработке и секреции IFN $\gamma$  Т-клетками, что обеспечит усиление общей цитотоксичности в отношении клеток-мишеней. Далее было высказано предположение, что внутриклеточные сигнальные пути, активируемые с помощью IL-21, будут предотвращать терминальную дифференцировку и связанную с этим потерю эффекторной функции и апоптоз. См. фигуру 3.

Дополнительные направления разработки включали валентность mAb (например, моновалентное или бивалентное mAb), потребность в Fc-эффекторной функции, сайт для слияния с цитокином (С- или N-конец mAb), включение линкера и устранение сайтов предсказанной вторичной модификации или отсечения.

В рамках экспериментальной проверки концепции изучали несколько форматов



слитых белков, и четыре конструкции, представляющие собой продукты слияния, клонировали и экспрессировали. IL-21 дикого типа (WT) слили с С-концом IgG бивалентного антитела mAb к PD-1 в виде (1) гомодимера IL-21 без какого-либо линкера; (2) гомодимера IL-21 с линкером GGGGS (SEQ ID NO: 262); (3) мономера IL-21 без какого-либо линкера, но с мутациями с заменой пар заряженных аминокислот в Fc IgG для активизации гетеродимеризации; и (4) мономера IL-21, содержащего как линкер GGGGS (SEQ ID NO: 262), так и мутации с заменой пар заряженных аминокислот. Все четыре конструкции слитых белков содержали следующие модификации в Fc-области mAb, пронумерованные в соответствии с системой EU: N297G, R292C, V302C (мутации SEFL2-2). Примененные мутации с заменой пар заряженных аминокислот представляли собой мутации V1 (т. е. K409D и K392D в одной тяжелой цепи и D399K и E356K в другой тяжелой цепи). Все четыре конструкции слитых белков были разработаны с обеспечением удаления С-концевого лизина для предотвращения отсечения.

Конструкции, представляющие собой продукты слияния, подвергали скринингу в отношении активности IL-21 в клеточных анализах с применением двух вариантов (PD-1<sup>+ve</sup> и PD-1<sup>-ve</sup>) IL-21R-положительных (IL-21R<sup>+</sup>) Т-клеток линии Hut78. В каждой клеточной линии фосфорилирование STAT3 измеряли в качестве суррогатной меры активности IL-21. Оба варианта клеток линии Hut78 подвергали воздействию (i) отдельно рекомбинантного IL-21 человека (rhIL-21), (ii) отдельно антитела mAb к PD-1, (iii) антитела mAb к PD-1, слитого с гомодимером IL-21 с помощью линкера, (iv) антитела mAb к PD-1, слитого с гомодимером IL-21 без линкера, (v) антитела mAb к PD-1, слитого с мономером IL-21 с помощью линкера, или (vi) антитела mAb к PD-1, слитого с мономером IL-21 без линкера. Результаты анализа фосфорилирования STAT3 и значения EC50 каждой молекулы в отношении передачи сигнала с помощью STAT показаны на фигурах 5А и 5В и в таблице 2, соответственно.

ТАБЛИЦА 2

| <u><b>Молекула</b></u>                                            | <u><b>PD-1<sup>-ve</sup></b></u> | <u><b>PD-1<sup>+ve</sup></b></u> |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                                                                   | <u><b>EC50 (нМ)</b></u>          | <u><b>EC50 (нМ)</b></u>          |
| rhIL-21                                                           | 153                              | 204                              |
| Антитело mAb к PD-1                                               | -                                | -                                |
| Продукт слияния антитела mAb к PD-1+гомодимера IL-21, без линкера | 1184                             | 97                               |
| Продукт слияния антитела mAb к PD-1+гомодимера IL-21, + линкер    | 1822                             | 60                               |
| Продукт слияния антитела mAb к PD-1+мономера IL-21,               | 523                              | 70                               |

|                                                                    |     |    |
|--------------------------------------------------------------------|-----|----|
| без линкера                                                        |     |    |
| Продукт слияния антитела<br>mAb к PD-1+мономера IL-21,<br>+ линкер | 392 | 58 |

Как показано на фигуре 5А и в таблице 2 (средний столбец), слитый белок, содержащий антитело mAb к PD-1 и гомодимер IL-21, проявлял в 10 раз меньшую молярную активность по сравнению с таковой rhIL-21 в клетках PD-1<sup>-ve</sup>. rhIL-21 также характеризовался большим значением молярной активности по сравнению со слитым белком, содержащим мономер IL-21. Несмотря на наличие только одного фрагмента IL-21, мономерный слитый белок показал большую молярную активность по сравнению с гомодимером, содержащим два фрагмента IL-21. Эти результаты предполагают, что мономер проявляет более высокую активность IL-21 в клетках PD-1<sup>-ve</sup>, и/или предполагают, что слитый белок в формате гомодимера может обеспечивать частичное ослабление активности IL-21 (например, возможно, благодаря стерическим взаимодействиям между фрагментами IL-21).

Это исследование также позволило оценить влияние наличия линкера между частью, представляющей собой IL-21, и С-концом IgG. Как показано в таблице 2 (средний столбец) и на фигурах 5А и 5В (сплошная линия=нет линкера; точечная пунктирная линия=линкер есть), наличие линкера, по-видимому, не влияет на активность IL-21. Следовательно, все последующие конструкции получали без линкера с целью уменьшить количество ненативных последовательностей в слитых белках.

Эффект экспрессии PD-1 в отношении активности IL-21 оценивали путем сравнения результатов анализа фосфорилирования STAT3 для клеток PD-1<sup>-ve</sup> и клеток PD-1<sup>+ve</sup>. Как показано на фигуре 5В, активность IL-21 каждого из слитых белков на основе гомодимера IL-21 и на основе мономера IL-21 в клетках PD-1<sup>+ve</sup> была по сути одинаковой.

В совокупности эти результаты демонстрируют, что передачу сигнала с помощью IL-21 в отсутствие экспрессии PD-1 в клетке-мишени можно ослаблять путем слияния IL-21 с антителом mAb к PD-1. Кроме того, передача сигнала с помощью IL-21 в случае IL-21, слитого с антителом mAb к PD-1, восстанавливается в клетках, экспрессирующих PD-1.

### ПРИМЕР 3

В этом примере демонстрируется разработка, конструкция и определение характеристик нескольких мутеинов IL-21.

Чтобы получить представление о фармакокинетическом/фармакодинамическом (PK/PD) профиле слитого белка, слитый белок, содержащий IgG, слитый с гомодимером IL-21 WT, тестировали *in vivo* на яванских макаках.

Слитый белок на основе гомодимера, содержащий IL-21 WT, слитый с антителом mAb к PD-1, вводили внутривенно 6 животным либо в низкой дозе (250 мкг/кг), либо в высокой дозе (1000 мкг/кг). Домен антитела IgG (150 мкг/кг) анализировали в качестве контроля. Концентрации в сыворотке крови измеряли в динамике и определяли C<sub>max</sub>,

AUC<sub>посл.</sub>, период полувыведения ( $t_{1/2}$ ), Vss и Cl. Результаты показаны на фигуре 6 и в таблице 3.

ТАБЛИЦА 3

| № животного                     | Доза (мкг/кг) | C <sub>max</sub> (мкг/мл) | AUC <sub>посл.</sub> (ч. * мкг/мл) | Период полувыведения ( $t_{1/2}$ ) (ч.) | Vss (мл/кг)        | CL (мл/ч./кг)     |
|---------------------------------|---------------|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|-------------------|
| 979                             | 250           | 78,5                      | 331                                | 9,99                                    | 7400               | 635               |
| 980                             | 250           | 72,4                      | 463                                | 10,6                                    | 7136               | 521               |
| 981                             | 250           | 101                       | 429                                | 19,6                                    | 8904               | 366               |
| <b>Среднее для низкой дозы</b>  | <b>250</b>    | <b>84,0 ± 15,1</b>        | <b>408 ± 69</b>                    | <b>13,4 ± 5,4</b>                       | <b>7813 ± 954</b>  | <b>507 ± 135</b>  |
| 982                             | 1000          | 401                       | 3500                               | 43                                      | 6943               | 281               |
| 983                             | 1000          | 414                       | 2746                               | 21,2                                    | 6953               | 361               |
| 984                             | 1000          | 486                       | 4345                               | 25,0                                    | 4996               | 226               |
| <b>Среднее для высокой дозы</b> | <b>1000</b>   | <b>434 ± 45,8</b>         | <b>3530 ± 800</b>                  | <b>29,7 ± 11,6</b>                      | <b>6297 ± 1127</b> | <b>289 ± 67,9</b> |

По сравнению с контрольным IgG (данные не показаны), слитый белок на основе гомодимера, содержащий антитело mAb к PD-1 и IL-21 WT, показал повышенный клиренс и более низкий уровень воздействия. Таким образом, было определено, что для усиления воздействия слитого белка и минимизации нецелевых эффектов IL-21 (т. е. минимизации передачи сигнала с помощью IL-21 на иммунные клетки, которые не экспрессируют рецептор PD-1), потребуется мутагенез IL-21 для ослабления передачи сигнала посредством IL-21R. Соответственно, слитый белок, содержащий мутантный IL-21, был разработан таким образом, чтобы он слабее связывался с IL-21R на клетках, которые не экспрессируют PD-1. Было выдвинуто предположение, что слитый белок сначала связывает мишень, представляющую собой PD-1 (посредством связывания с помощью антитела к PD-1), с высокой аффинностью, что затем будет активизировать второе взаимодействие с более низкой аффинностью между мутеином IL-21 и IL-21R (альфа-цепь). Предполагалось, что в случае отсутствия рецептора PD-1 слитые белки не будут связываться с клетками, не экспрессирующими рецептор PD-1, независимо от экспрессии IL-21R.

Для создания панели из 141 мутеина IL-21 применяли структурную инженерию, при этом каждый из них содержал одну аминокислотную замену по сравнению с

аминокислотной последовательностью IL-21 WT. Каждый мутеин сконструировали таким образом, чтобы он характеризовался пониженной аффинностью либо в отношении альфа-субъединицы IL-21R (101 мутеин), либо в отношении гамма-субъединицы IL-21R (40 мутеинов). Каждый мутеин панели был экспрессирован в виде слитого белка с антителом mAb к PD-1 (мутеин PD-1 x IL-21), а затем оценен на его способности связываться с IL-21R с применением системы Octet® от FortéBio (Pall FortéBio; Фримонт, Калифорния) и подвергнут скринингу в отношении активности с применением линии Т-клеток IL-21R+ (Hut78) с применением фосфорилирования STAT3 в качестве суррогата активности IL-21. Для отбора мутеинов, которые характеризуются наименьшим потенциалом в отношении нецелевой активности, критерии отбора установили в виде более чем 20-кратного ослабления уровня передачи сигнала с помощью IL-21 по сравнению с rhIL-21 при 3,7 нМ на клетках PD-1<sup>ve</sup>.

Полный список из 141 мутеина приведен в таблице 4.

ТАБЛИЦА 4

| Мутантный вариант | Замена АА в IL-21 | SEQ ID NO: | Мутеин $\alpha$ -цепи или $\gamma$ -цепи IL-21 | Kd IL-21R-Fc (нМ) | Кратность уменьшения аффинности |
|-------------------|-------------------|------------|------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------|
| 1                 | R5D               | 74         | $\alpha$                                       | NB                |                                 |
| 2                 | R5E               | 75         | $\alpha$                                       | NB                |                                 |
| 3                 | R5G               | 76         | $\alpha$                                       | NB                |                                 |
| 4                 | R5H               | 77         | $\alpha$                                       | WB                |                                 |
| 5                 | R5I               | 78         | $\alpha$                                       | WB                |                                 |
| 6                 | R5K               | 79         | $\alpha$                                       | WB                |                                 |
| 7                 | R5L               | 80         | $\alpha$                                       | WB                |                                 |
| 8                 | R5M               | 81         | $\alpha$                                       | WB                |                                 |
| 9                 | R5N               | 82         | $\alpha$                                       | NB                |                                 |
| 11                | R5S               | 84         | $\alpha$                                       | WB                |                                 |
| 12                | R5T               | 85         | $\alpha$                                       | WB                |                                 |
| 13                | R5V               | 86         | $\alpha$                                       | WB                |                                 |
| 14                | R5Y               | 87         | $\alpha$                                       | WB                |                                 |
| 15                | I8A               | 88         | $\alpha$                                       | WB                |                                 |
| 16                | I8D               | 89         | $\alpha$                                       | WB                |                                 |
| 17                | I8E               | 90         | $\alpha$                                       | NB                |                                 |
| 18                | I8G               | 91         | $\alpha$                                       | WB                |                                 |
| 19                | I8N               | 92         | $\alpha$                                       | WB                |                                 |

|    |      |     |          |       |       |
|----|------|-----|----------|-------|-------|
| 22 | R9D  | 95  | $\alpha$ | >100  |       |
| 23 | R9E  | 96  | $\alpha$ | NB    |       |
| 29 | R9M  | 102 | $\alpha$ | WB    |       |
| 30 | R9N  | 103 | $\alpha$ | WB    |       |
| 31 | R9Q  | 104 | $\alpha$ | WB    |       |
| 32 | R9S  | 105 | $\alpha$ | WB    |       |
| 33 | R9T  | 106 | $\alpha$ | WB    |       |
| 34 | R9V  | 107 | $\alpha$ | WB    |       |
| 24 | R9G  | 97  | $\alpha$ | ~40   |       |
| 74 | K75D | 156 | $\alpha$ | 19,86 |       |
| 79 | R76E | 161 | $\alpha$ | 18,47 | 738,8 |
| 86 | R76N | 168 | $\alpha$ | 15,31 | 612,4 |
| 78 | R76D | 160 | $\alpha$ | ~12   |       |
| 77 | R76A | 159 | $\alpha$ | ~11   | 440   |
| 43 | L13D | 112 | $\alpha$ | 11    | 440   |
| 59 | S70P | 138 | $\alpha$ | ~10   |       |
| 62 | K72P | 143 | $\alpha$ | 8,958 |       |
| 53 | I66P | 132 | $\alpha$ | 7,11  |       |
| 21 | R9A  | 94  | $\alpha$ | 6,836 |       |
| 20 | I8S  | 93  | $\alpha$ | ~4    | 160   |
| 52 | I66G | 131 | $\alpha$ | 4,552 |       |
| 95 | K77P | 177 | $\alpha$ | 2,056 |       |
| 26 | R9I  | 99  | $\alpha$ | 2,2   |       |
| 42 | Q12V | 249 | $\alpha$ | <2,2  | 88    |
| 70 | K73P | 152 | $\alpha$ | ~2    | 80    |
| 80 | R76G | 162 | $\alpha$ | ~2    | 80    |
| 81 | R76H | 163 | $\alpha$ | ~2    | 80    |
| 56 | V69P | 135 | $\alpha$ | 1,989 |       |
| 10 | R5Q  | 83  | $\alpha$ | 2,1   |       |
| 27 | R9K  | 100 | $\alpha$ | 2     |       |
| 91 | R76V | 173 | $\alpha$ | 1,765 |       |
| 47 | Y23D | 48  | $\alpha$ | 1,7   | 68    |
| 28 | R9L  | 101 | $\alpha$ | 1,6   |       |
| 96 | P78D | 61  | $\alpha$ | 1,228 |       |

|     |      |     |          |            |        |
|-----|------|-----|----------|------------|--------|
| 73  | K73V | 155 | $\alpha$ | 1,071      |        |
| 89  | R76S | 171 | $\alpha$ | 1,05       | 42     |
| 76  | K75P | 158 | $\alpha$ | $\sim 1$   | 40     |
| 57  | S70E | 136 | $\alpha$ | 0,9481     |        |
| 50  | R65P | 129 | $\alpha$ | 0,9        |        |
| 88  | R76Q | 170 | $\alpha$ | 0,7702     |        |
| 51  | I66D | 130 | $\alpha$ | 0,6773     |        |
| 94  | K77G | 176 | $\alpha$ | 0,658      |        |
| 85  | R76M | 167 | $\alpha$ | $\sim 0,6$ | 24     |
| 35  | R9Y  | 108 | $\alpha$ | 0,63       |        |
| 58  | S70G | 137 | $\alpha$ | 0,5181     |        |
| c6  | D15A | 117 | $\gamma$ | 0,4389     |        |
| 64  | K73D | 146 | $\alpha$ | 0,4354     |        |
| c1  | R11D | 109 | $\gamma$ | 0,4113     |        |
| 87  | R76P | 169 | $\alpha$ | $\sim 0,4$ | 16     |
| 37  | Q12D | 249 | $\alpha$ | 0,42       |        |
| 39  | Q12N | 251 | $\alpha$ | 0,38       |        |
| 82  | R76I | 164 | $\alpha$ | 0,3159     | 12,636 |
| 97  | P79D | 62  | $\alpha$ | 0,3152     |        |
| 99  | S80P | 179 | $\alpha$ | 0,3089     |        |
| 40  | Q12S | 252 | $\alpha$ | 0,32       |        |
| 92  | R76Y | 174 | $\alpha$ | 0,2651     |        |
| 98  | S80G | 178 | $\alpha$ | 0,265      |        |
| 66  | K73G | 148 | $\alpha$ | 0,2528     |        |
| 61  | K72G | 142 | $\alpha$ | 0,2502     |        |
| c7  | D15E | 118 |          | 0,2492     |        |
| 41  | Q12T | 253 | $\alpha$ | $< 0,26$   |        |
| 100 | R5A  | 73  | $\alpha$ | 0,2375     |        |
| 101 | S70Y | 139 | $\alpha$ | 0,2366     |        |
| 60  | K72D | 141 | $\alpha$ | 0,235      |        |
| c3  | I14A | 114 | $\gamma$ | 0,2153     |        |
| c8  | D15I | 119 | $\gamma$ | 0,2151     |        |
| 55  | V69G | 134 | $\alpha$ | 0,2148     |        |
| 36  | Q12A | 111 | $\alpha$ | 0,23       |        |

|                          |      |     |          |             |   |
|--------------------------|------|-----|----------|-------------|---|
| c4                       | I14D | 115 | $\gamma$ | 0,2022      |   |
| 83                       | R76K | 165 | $\alpha$ | ~0,2        | 8 |
| 84                       | R76L | 166 | $\alpha$ | ~0,2        | 8 |
| 67                       | K73H | 149 | $\alpha$ | 0,1901      |   |
| 72                       | K73S | 154 | $\alpha$ | 0,1667      |   |
| c5                       | I14S | 116 | $\gamma$ | 0,1658      |   |
| c9                       | D15M | 120 | $\gamma$ | 0,1633      |   |
| 75                       | K75G | 157 | $\alpha$ | 0,1627      |   |
| 46                       | Q19D | 47  | $\alpha$ | 0,17        |   |
| c2                       | R11S | 110 | $\gamma$ | 0,1346      |   |
| 49                       | R65G | 128 | $\alpha$ | 0,13        |   |
| 90                       | R76T | 172 | $\alpha$ | 0,105       |   |
| 44                       | I16D | 125 | $\alpha$ | 0,094       |   |
| Антитело Ab<br>к PD-1*   | --   |     |          | ~0,07-0,092 |   |
| 48                       | R65D | 127 | $\alpha$ | 0,088       |   |
| 25                       | R9H  | 98  | $\alpha$ | 0,084       |   |
| 69                       | K73N | 151 | $\alpha$ | 0,07368     |   |
| 65                       | K73E | 147 | $\alpha$ | 0,07262     |   |
| 45                       | I16E | 126 | $\alpha$ | 0,076       |   |
| 71                       | K73Q | 153 | $\alpha$ | 0,06919     |   |
| 63                       | K73A | 145 | $\alpha$ | 0,0525      |   |
| 68                       | K73I | 150 | $\alpha$ | 0,1724      |   |
| 54                       | V69D | 133 | $\alpha$ | 0,03952     |   |
| 38                       | Q12E | 250 | $\alpha$ | 0,031       |   |
| huIL-21**                | --   |     |          | 0,025-0,027 |   |
| Антитело Ab<br>к PD-1*** | --   |     |          | NB          |   |

NB=связывание не обнаружено

WB=слабое связывание (ниже достоверного предела количественного определения)

Замены AA в IL-21 соответствуют нумерации аминокислотных положений в SEQ ID NO: 1.

\* Антитело mAb к PD-1, слитое с IL-21 человека (без мутаций)

\*\* Не в виде продукта слияния; присутствует в виде отдельного IL-21 человека

\*\*\* Не в виде продукта слияния; присутствует в виде отдельного антитела Ab к PD-1

Иллюстративные результаты анализов фосфорилирования STAT3 с применением мутеинов IL-21 показаны на фигуре 7 (мутеины с пониженной аффинностью к IL-21R $\alpha$ ) и на фигуре 8 (мутеины с пониженной аффинностью в отношении IL-21R $\gamma$ ). Как показано на этих фигурах, несколько мутеинов демонстрировали более чем 20-кратное ослабление активности IL-21 в клетках PD-1<sup>-ve</sup>, но сохраняли активность в клетках PD-1<sup>+ve</sup>. Как показано на фигурах 9А-9В, мутантный вариант 51 (R65P) (синие круги) был одним из таких мутантных вариантов, который демонстрировал более чем 20-кратное снижение активности IL-21 в клетках PD<sup>-ve</sup>, но проявлял уровень активности IL-21, который являлся сходным с таковым, достигаемым с помощью rhIL-21 в клетках, экспрессирующих PD-1. Список иллюстративных мутеинов, отобранных по показателю более чем 20-кратного ослабления сигнала STAT3 в клетках с низким/отрицательным уровнем экспрессии PD-1, представлен в таблице 5.

ТАБЛИЦА 5

| № мутантного варианта | Замена AA | SEQ ID NO: | Аффинность в отношении IL-21R (K <sub>D</sub> (нМ)) | Кратность уменьшения аффинности <sup>1</sup> | N1                                                   |                                                      | N2                                                   |                                                      |
|-----------------------|-----------|------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
|                       |           |            |                                                     |                                              | Кратность уменьшения в PD-1 <sup>-ve</sup> (rhIL-21) | Кратность уменьшения в PD-1 <sup>+ve</sup> (rhIL-21) | Кратность уменьшения в PD-1 <sup>-ve</sup> (rhIL-21) | Кратность уменьшения в PD-1 <sup>+ve</sup> (rhIL-21) |
| 20                    | I8S       | 93         | ~4                                                  | 160                                          | 38,1                                                 | 4,4                                                  | 58,8                                                 | 5,7                                                  |
| 42                    | Q12V      | 249        | <2,2                                                | 88                                           | 80                                                   | 2,4                                                  | 44                                                   | 6,9                                                  |
| 43                    | L13D      | 112        | 11                                                  | 440                                          | 83,8                                                 | 2,3                                                  | 25,7                                                 | 2,6                                                  |
| 47                    | Y23D      | 48         | 1,7                                                 | 68                                           | 35,6                                                 | 1,4                                                  | 13,7                                                 | 1,4                                                  |
| 70                    | K73P      | 152        | ~2                                                  | 80                                           | 46,4                                                 | 1,8                                                  | 21                                                   | 1,7                                                  |
| 76                    | K75P      | 158        | ~1                                                  | 40                                           | 25,1                                                 | 1,7                                                  | 36                                                   | 1,6                                                  |
| 77                    | R76A      | 159        | ~11                                                 | 440                                          | 29,9                                                 | 2,6                                                  | 20                                                   | 3                                                    |
| 79                    | R76E      | 161        | 18,47                                               | 738,8                                        | 40,2                                                 | 2,6                                                  | 23,2                                                 | 2,5                                                  |
| 80                    | R76G      | 162        | ~2                                                  | 80                                           | 31,4                                                 | 1,5                                                  | 17                                                   | 1,6                                                  |
| 81                    | R76H      | 163        | ~2                                                  | 80                                           | 23,4                                                 | 1,5                                                  | 38,6                                                 | 1,8                                                  |
| 82                    | R76I      | 164        | 0,3159                                              | 12,636                                       | 25,1                                                 | 1,5                                                  | 28,2                                                 | 1,6                                                  |
| 83                    | R76K      | 165        | ~0,2                                                | 8                                            | 19,3                                                 | 1,7                                                  | 27,4                                                 | 1,4                                                  |
| 84                    | R76L      | 166        | ~0,2                                                | 8                                            | 24,4                                                 | 1,6                                                  | 29,1                                                 | 1,5                                                  |
| 85                    | R76M      | 167        | ~0,6                                                | 24                                           | 21,8                                                 | 1,4                                                  | 28,2                                                 | 1,4                                                  |
| 86                    | R76N      | 168        | 15,31                                               | 612,4                                        | 30,1                                                 | 3                                                    | 21,1                                                 | 4,2                                                  |
| 87                    | R76P      | 169        | ~0,4                                                | 16                                           | 26,5                                                 | 1,7                                                  | 34,4                                                 | 1,6                                                  |
| 89                    | R76S      | 171        | 1,05                                                | 42                                           | 32,7                                                 | 1,3                                                  | 28,9                                                 | 1,1                                                  |
| C10                   | D15N      | 121        | 11                                                  | 87,3                                         | 16,9                                                 | 4,1                                                  | 39,7                                                 | 4,7                                                  |
| C12                   | D15S      | 123        | 6,6                                                 | 52,4                                         | 16,4                                                 | 3,2                                                  | 36,4                                                 | 3,5                                                  |
| C14                   | D15V      | 124        | 5,471                                               | 43,4                                         | 20,1                                                 | 4,7                                                  | 35                                                   | 5,7                                                  |
| C18                   | S113K     | 67         | 8,098                                               | 64,3                                         | 20,8                                                 | 3,2                                                  | 42                                                   | 3,9                                                  |



|     |       |     |       |      |      |     |      |     |
|-----|-------|-----|-------|------|------|-----|------|-----|
| C21 | Q116E | 182 | 7,949 | 63,1 | 26,9 | 5,4 | 52,1 | 6,5 |
|-----|-------|-----|-------|------|------|-----|------|-----|

<sup>1</sup> по сравнению с rhIL-21

#### ПРИМЕР 4

В этом примере продемонстрирован отбор кандидатных мутеинов IL-21 для применения в конструировании слитых белков и их исследование *in vivo*.

Увеличивали количество 22 мутеинов IL-21 с наилучшими характеристиками для дальнейшего тестирования. Основываясь на этом дополнительном тестировании (в анализах pSTAT3 на линии Nut78, как описано в данном документе), были отобраны четыре кандидатных слитых белка таким образом, чтобы коллекция из этих четырех слитых белков демонстрировала диапазон ослабления (сдвиг молярной активности относительно rhIL-21 в анализе pSTAT3 на линии Nut78). Мутантный вариант C10 (D15N) представлял мутеин с низким коэффициентом ослабления, мутантный вариант 77 (R76A) представлял мутеин с промежуточным коэффициентом ослабления, а мутантные варианты 79 и 78 (R76E и R76D соответственно) представляли мутеин с высоким коэффициентом ослабления. Увеличивали количество трех из четырех мутеинов для исследования *in vivo* на яванских макаках для оценки фармакокинетических свойств конструкций, представляющих собой слитый белок на основе мутеина. Однократные дозы (10 мг/кг) мутантного варианта 79 (R76E), мутантного варианта 77 (R76A) или мутантного варианта C10 (D15N) вводили внутривенно (болюсно) ранее не подвергавшимся воздействию яванским макакам и данные по концентрации в сыворотке крови собирали в течение десятидневного периода. Для сравнения, антитело mAb к PD-1 и слитый белок, содержащий антитело mAb к PD-1 и IL-21 WT, вводили (индивидуально) яванским макакам путем внутривенного болюсного введения. Исследование проводили с двумя контролями: отдельным антителом mAb к PD-1 и конструкцией, представляющей собой слитый белок, содержащий антитело mAb к PD-1 и IL-21 WT. Как показано на фигуре 10, каждый из слитых белков антитело mAb к PD-1-мутеин IL-21 демонстрировал измененный фармакокинетический профиль по сравнению с исходным антителом mAb к PD-1 (черные треугольники). В таблице 6 приведены фармакокинетические свойства, аппроксимированные с помощью некомпартментного анализа.

ТАБЛИЦА 6

| Конструкция                                    | Доза<br>(мг/кг) | C <sub>15 мин.</sub><br>(мкг/мл) | AUC <sub>посл.</sub><br>(ч.*мкг/мл) | V <sub>ss</sub><br>(мл/кг) | CL<br>(мл/ч./кг) | Период<br>полувыведения<br>(ч.) |
|------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|------------------|---------------------------------|
| Антитело mAb к PD-1:IL-21(R76E) <sup>a</sup> . | 10              | 53 ± 7                           | 309 ± 50                            | 210 ± 30                   | 33 ± 5           | 26 ± 13                         |

|                                                    |      |                 |                  |                  |                 |               |
|----------------------------------------------------|------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|---------------|
| b                                                  |      |                 |                  |                  |                 |               |
| Антитело<br>mAb к PD-<br>1:IL-<br>21(R76A)<br>a, b | 10   | $4,7 \pm 1,4$   | $28,2 \pm 9,3$   | $2900 \pm 700$   | $380 \pm 110$   | $21 \pm 14$   |
| Антитело<br>mAb к PD-<br>1:IL-<br>21(D15N)<br>a, b | 10   | $2,4 \pm 1$     | $8,0 \pm 2,8$    | $10000 \pm 4000$ | $1400 \pm 600$  | $15 \pm 9$    |
| Антитело<br>mAb <sup>a, c</sup> к<br>PD-1          | 8,25 | $200 \pm 9$     | $23600 \pm 1500$ | $56 \pm 5$       | $0,20 \pm 0,01$ | $200 \pm 18$  |
| Антитело<br>mAb к PD-<br>1:IL-21 <sup>c, d</sup>   | 1,0  | $0,27 \pm 0,02$ | $0,32 \pm 0,02$  | $5600 \pm 800$   | $2900 \pm 200$  | $2,8 \pm 0,2$ |

<sup>A</sup> Исследование на приматах, не являющихся людьми

<sup>b</sup> Захват IL21 человека с обнаружением Fc человека

<sup>c</sup> Захват Fc человека с обнаружением Fc человека

<sup>d</sup> Исследование на приматах, не являющихся людьми

#### ПРИМЕР 5

В этом примере продемонстрированы получение панели двойных мутантных вариантов IL-21, а также экспрессия и определение характеристик слитых белков, содержащих гомодимеры двойных мутантных вариантов IL-21 (если не указано иное).

Три мутеина, содержащие по одной аминокислотной замене, в том числе мутантный вариант № 77 (R76A) и мутантный вариант № 79 (R76E), были отобраны для дополнительного конструирования на основе данных клеточной активности (например, наиболее высокая степень ослабления активности на Т-клетках Hut78 PD-1<sup>-ve</sup>) и технологичности. Структурную инженерию применяли для получения дополнительной мутации в последовательности одинарного мутантного варианта IL-21 (т. е. для получения двойного мутантного варианта) для дополнительного ослабления связывания цитокинов с альфа-цепью IL-21R (IL-21R $\alpha$ ). Последовательность двойного мутантного варианта подвергали слиянию с последовательностью антитела mAb к PD-1, и слитые белки

подвергали экспрессии и тестировали в клеточных анализах. Список полученных и протестированных слитых белков на основе двойного мутантного варианта представлен в таблице 7.

ТАБЛИЦА 7

| № двойного мутеина | Аминокислотные замены | SEQ ID NO: |
|--------------------|-----------------------|------------|
| 1                  | D15N, I71L            | 214        |
| 2                  | D15N, K72A            | 215        |
| 3                  | D15N, K73A            | 216        |
| 4                  | D15N, S70T            | 213        |
| 5                  | I71L, K73Q            | 217        |
| 6                  | I71L, R76A            | 227        |
| 7                  | I71L, R76D            | 228        |
| 8                  | I71L, R76E            | 229        |
| 9                  | K72A, K73Q            | 218        |
| 10                 | K72A, R76A            | 230        |
| 11                 | K72A, R76D            | 231        |
| 12                 | K72A, R76E            | 232        |
| 13                 | K73A, R76A            | 233        |
| 14                 | K73A, R76D            | 234        |
| 15                 | K73A, R76E            | 235        |
| 17                 | S70T, K73Q            | 255        |
| 18                 | S70T, R76A            | 246        |
| 19                 | S70T, R76D            | 247        |
| 20                 | S70T, R76E            | 248        |
| 21                 | R9E, R76E             | 245        |
| 22                 | R9A, R76E             | 243        |
| 23                 | R5E, R76E             | 239        |
| 24                 | R5A, R76E             | 237        |
| 25                 | R5Q, R76E             | 241        |
| 26                 | R9E, R76A             | 244        |
| 27                 | R9A, R76A             | 242        |
| 28                 | R5E, R76A             | 238        |
| 29                 | R5A, R76A             | 236        |
| 30                 | R5Q, R76A             | 240        |

Поскольку требовались слитые белки на основе двойных мутантных вариантов со

свойствами значительного ослабления, критерий отбора был установлен в виде значения молярной активности ( $EC_{50}$ ), превышающего 1000 нМ, на IL-21R-положительных, PD-1-отрицательных (PD-1<sup>-ve</sup>) Т-клетках линии Hut78 относительно молярной активности rhIL-21. Кроме того, как и в случае мутеинов, содержащих одну аминокислотную замену, для слитых белков на основе двойных мутантных вариантов были определены характеристики связывания IL-21R (Octet от ForteBio). Наконец, для слитых белков на основе двойных мутантных вариантов были определены характеристики активности PD-1 с применением анализа репортерного гена PD-1 в линии Jurkat. Результаты этого анализа показаны в таблице 8.

ТАБЛИЦА 8

| Тестиру<br>емый<br>слитый<br>белок | EC50<br>pSTAT3<br>(нМ) в<br>PD-1 <sup>+</sup> Т-<br>клетках<br>линии<br>Hut78<br>(n1) | EC50<br>pSTAT3<br>(нМ) в<br>PD-1 <sup>+</sup> Т-<br>клетках<br>линии<br>Hut78<br>(n2) | EC50<br>pSTAT3<br>(нМ) в<br>PD-1 <sup>-</sup> Т-<br>клетках<br>линии<br>Hut78<br>(n1) | EC50<br>pSTAT3<br>(нМ) в<br>PD-1 <sup>-</sup> Т-<br>клетках<br>линии<br>Hut78<br>(n2) | K <sub>D</sub><br>(нМ)<br>IL-<br>21R<br>чел. | K <sub>D</sub><br>(нМ)<br>IL-<br>21R<br>яв.<br>мак. | K <sub>D</sub><br>(нМ)<br>PD-1<br>чел. | K <sub>D</sub><br>(нМ)<br>PD-1<br>яв.<br>мак. |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------|
| rhIL-21                            | 0,085                                                                                 | 0,053                                                                                 | 0,056                                                                                 | 0,050                                                                                 | 0,028-<br>0,037                              | 0,019-<br>0,051                                     | -                                      | -                                             |
| R76A                               | 0,341                                                                                 | 0,147                                                                                 | 100,277                                                                               | 35,477                                                                                | >10<br>(две<br>фазы)                         | >10<br>(две<br>фазы)                                | 7,5                                    | 6,4                                           |
| R76E                               | 0,744                                                                                 | 0,376                                                                                 | 194,523                                                                               | 122,87                                                                                | >10<br>(две<br>фазы)                         | >10<br>(две<br>фазы)                                | 7,2                                    | 6,0                                           |
| Мономе<br>рный<br>R76E             | 0,197                                                                                 | 0,136                                                                                 | 23,516                                                                                | 26,965                                                                                | >10<br>(две<br>фазы)                         | >10<br>(две<br>фазы)                                | 5,8                                    | 7,3                                           |
| R5E:R76<br>A                       | 1,979                                                                                 | 1,487                                                                                 | >1000                                                                                 | >1000                                                                                 | > 300                                        | >300                                                | 7,0                                    | 5,9                                           |
| R5Q:R76<br>E                       | 2,211                                                                                 | 1,663                                                                                 | >1000                                                                                 | >1000                                                                                 | > 300                                        | >300                                                | 6,3                                    | 6,3                                           |

|                            |      |   |       |       |       |      |      |     |
|----------------------------|------|---|-------|-------|-------|------|------|-----|
| R9E:R76<br>A               | 16,6 | - | >1000 | >1000 | > 300 | >300 | 8,9  | 5,9 |
| Антител<br>о mAb к<br>PD-1 | -    | - | -     | -     | -     | -    | 13,4 | 6,3 |

| Тестируемый слитый белок | Репортер hPD1 N1<br>(нМ) | Репортер hPD1 N2<br>(нМ) |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| R76A                     | 1,44                     | 2,17                     |
| R76E                     | 0,85                     | 1,68                     |
| Мономерный R76E          | 0,685                    | 0,637                    |
| R5Q:R76E                 | 0,954                    | 0,942                    |
| Антитело mAb к PD-1      | 1,39                     | 1,77                     |

чел. = человек; яв. мак. = яванский макак

EC50 pSTAT3 (2,5-кратное изменение)

Oc tet: связывание с иммобилизованным моновалентным IL-21R-his человека и яванского макака

Как показано в таблице 8, слитые белки на основе двойных мутантных вариантов проявляли очень низкую активность IL-21 в Т-клетках, экспрессирующих низкие уровни PD-1 (например, ниже обнаруживаемых уровней PD-1), но сохраняли существенный уровень активности IL-21 в PD-1-экспрессирующих клетках. Слитые белки на основе двойных мутантных вариантов проявляли слабый уровень связывания с IL-21R ( $K_d > 300$  нМ), но сохраняли способность связываться с PD-1 и блокировать передачу сигнала с помощью PD-1.

#### ПРИМЕР 6

В этом примере продемонстрирован анализ первичных клеток *in vitro*, с помощью которого осуществляют сравнение слитых белков, содержащих антитело mAb к PD-1 и либо гомодимер двойного мутантного варианта IL-21, либо гомодимер одинарного мутантного варианта IL-21.

Слитый белок, содержащий антитело mAb к PD-1 и IL-21 с аминокислотными заменами R5Q и R76E, тестировали в анализе первичных клеток *in vitro* (реакция смешанной культуры лимфоцитов (MLR)). MLR предусматривала смешанную популяцию из IL-21R<sup>+</sup> клеток, в том числе дендритных клеток (DC), экспрессирующих IL-21R, но не экспрессирующих PD-1, Т-клеток, экспрессирующих PD-1, и Т-клеток, не экспрессирующих PD-1. MLR подвергали воздействию (i) слитого белка, содержащего аминокислотные замены R5Q и R76E, (ii) слитого белка, содержащего только аминокислотную замену R76E, (iii) рекомбинантного IL-21 человека (rHu IL-21), (iv)

антитела mAb к PD-1, (v) комбинации гHu IL-21 и антитела mAb к PD-1 или (vi) контрольного IgG.

Как показано на фигуре 11, rhIL-21 подавлял функцию DC и являлся доминантным в отношении ответа на PD-1 при одновременном введении. Слитый белок, содержащий двойной мутеин IL-21 с ослабленной активностью, проявлял пониженную нецелевую активность. Кроме того, каждый из rhIL-21 и слитого белка, содержащего только аминокислотную замену R76E, проявлял существенную нецелевую активность в отношении DC и подавлял выработку цитокинов. Напротив, антитело mAb к PD-1 и слитый белок, содержащий аминокислотные замены R5Q и R76E, обеспечивали доставку сигналов IL-21 только к Т-клеткам-мишеням PD-1<sup>+ve</sup> (а не дендритным клеткам PD-1<sup>-ve</sup>) и сохраняли способность (посредством плеча PD-1) увеличивать выработку цитокинов. Соответственно, эти результаты дают основание предположить, что слитые белки, содержащие двойной мутантный вариант IL-21, оказывают менее выраженные иммунодепрессивное и пагубное воздействия на примирование DC и могут обеспечить рекрутирование новых клонов Т-клеток и более долговременные противоопухолевые иммунные ответы.

#### ПРИМЕР 7

В данном примере продемонстрирована активность различных слитых белков, содержащих двойные мутеины IL-21 (гомодимеры) и антитело mAb к PD-1, в отношении первичных цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL). Уровень эндогенного фосфорилирования STAT3 в первичных CTL (CMV-реактивные линии CTL от донора-человека) измеряли с помощью FACS и применяли в качестве меры передачи сигнала с помощью IL-21. После выдерживания CTL в состоянии покоя в течение 48 часов (для уменьшения уровня экспрессии PD-1) клетки подвергали (в течение 10 мин.) воздействию (i) слитого белка, содержащего двойной мутеин IL-21 R5E/R76A (красная линия на левом графике), (ii) слитого белка, содержащего двойной мутеин IL-21 R5Q/R76E (красная линия на среднем графике), (iii) слитого белка, содержащего двойной мутеин IL-21 R9E/R76A (красная линия на правом графике), (iv) контрольного IgG1 (серая линия на каждом графике), (v) rhIL-21 (синяя линия на каждом графике), (vi) антитела mAb к PD-1 (сплошная зеленая линия на каждом графике), (vii) комбинации rhIL-21 и антитела mAb к PD-1 (точечная пунктирная зеленая линия на каждом графике) или (viii) слитого белка, содержащего одинарный мутеин IL-21 R76E (фиолетовая линия на каждом графике). Результаты FACS показаны на фигурах 12А-12С. Строят график зависимости значения активности IL-21 для каждого слитого белка, содержащего двойной мутеин IL-21, от значения активности, достигнутого в случае (iv) контрольного IgG1, (v) rhIL-21, (vi) антитела mAb к PD-1, (vii) комбинации rhIL-21 и антитела mAb к PD-1 и (viii) слитого белка, содержащего одинарный мутеин IL-21 R76E. Этот анализ первичных клеток демонстрирует, что продукты слияния на основе двойных мутантных вариантов слабо стимулируют индуцируемую IL-21 передачу сигнала с помощью STAT3 в CTL, находящихся в состоянии покоя (которые экспрессируют низкие уровни PD-1). Активность IL-21 наиболее ослаблена в случае продуктов слияния на основе двойных мутеинов (и

сходна с таковой, наблюдаемой в случае антитела mAb к PD-1 и контрольного IgG1), при этом продукт слияния на основе одинарного мутантного варианта проявляет умеренный уровень ослабления активности IL-21, и комбинация rhIL-21 и антитела mAb к PD-1 характеризуется активностью, сходной с таковой rhIL-21.

Также изучали эффект слитых белков, содержащих антитело mAb к PD-1 и гомодимеры двойных мутеинов IL-21, в отношении функции клеточной цитотоксичности, опосредованной CTL, при длительной стимуляции. CTL активировали с помощью CD3/CD28 и подвергали воздействию (i) слитого белка, содержащего двойной мутеин IL-21 R5E/R76A, (ii) слитого белка, содержащего двойной мутеин IL-21 R5Q/R76E, (iii) слитого белка, содержащего двойной мутеин IL-21 R9E/R76A, (iv) контрольного IgG4, (v) rhIL-21, (vi) антитела mAb к PD-1 или (vii) комбинации rhIL-21 и антитела mAb к PD-1. После семи дней стимуляции клетки совместно культивировали с линией раковых клеток меланомы, активированной пептидами CMV, и измеряли цитотоксичность. Результаты этого анализа показаны на фигурах 13A-13C.

Как показано на фигурах 13A-13C, слитые белки обладают способностью поддерживать функцию CTL в большей степени по сравнению с монотерапией с помощью антитела mAb к PD-1. Слитые белки на основе мутеинов IL-21 могут поддерживать функцию цитотоксичности, опосредованную CTL, при длительной стимуляции. Эти результаты подтверждают идею о том, что IL-21 может поддерживать функцию CTL в условиях длительной активации, как это наблюдается при раке. Доставка IL-21 к PD-1+ антиген-специфическим Т-клеткам может избирательно поддерживать функцию популяции Т-клеток, которая активизирует терапевтическую эффективность.

#### ПРИМЕР 8

В данном примере продемонстрирована фармакокинетика *in vivo* в случае конструкций на основе двойных мутеинов.

Слитые белки, содержащие антитело mAb к PD-1 и либо двойной мутеин IL-21, либо одинарный мутеин IL-21, вводили не подвергавшимся воздействию яванским макакам посредством внутривенного болюсного введения для определения характеристик воздействия лекарственного средства. В таблице 9 показана доза каждой конструкции, вводимой животным. Вариант на основе одинарного мутеина (IL-21 R76E) тестировали *in vivo* в виде гомодимера и мономера для лучшего понимания того, как можно дополнительно обеспечить улучшение в отношении воздействия.

Профили зависимости концентрации в сыворотке крови от времени для антител mAb к PD-1 и продуктов слияния антитело к PD-1:IL-21 после внутривенного болюсного введения не подвергавшимся воздействию яванским макакам показаны на фигуре 14, при этом уровни воздействия лекарственного средства, наблюдаемые в течение первой недели после введения, перечислены в таблице 9.

ТАБЛИЦА 9

| Номер | Конструкция | Доза | AUC <sub>0-168</sub> /доза |
|-------|-------------|------|----------------------------|
|-------|-------------|------|----------------------------|

| животного |                                                | (мг/кг) | (ч.*кг*мкг/мл/мг) |
|-----------|------------------------------------------------|---------|-------------------|
|           | Антитело mAb к PD-1 <sup>a, b</sup>            | 8,25    | 2260 ± 150        |
|           | PD-1:гомомимер IL-21(R76A) <sup>a, c</sup>     | 10      | 2,82 ± 0,93       |
| 803 и 804 | PD-1:гомомимер IL-21(R5E/R76A) <sup>d, c</sup> | 5       | 39,1 ± 14,0       |
| 801 и 802 | PD-1:гомомимер IL-21(R76E) <sup>d, c</sup>     | 5       | 38,0 ± 19,6       |
| 807 и 808 | PD-1:моновалентный IL-21(R76E) <sup>d, c</sup> | 5       | 195 ± 4,8         |
| 805 и 806 | PD-1:гомомимер IL-21(R5Q/R76E) <sup>c, d</sup> | 5       | 114 ± 14          |

<sup>a</sup> Исследование на приматах, не являющихся людьми

<sup>b</sup> Захват Fc человека с обнаружением Fc человека

<sup>c</sup> Захват IL-21 человека с обнаружением Fc человека

<sup>d</sup> Исследование на приматах, не являющихся людьми

<sup>e</sup> Захват PD-1 с обнаружением IL21 человека

Как показано в таблице 9, слитый белок на основе мономерного R76E проявлял значительно превосходящий уровень воздействия при внутривенном введении доз по сравнению со слитым белком на основе гомодимера R76E. Для слитых белков, содержащих двойные мутеины IL-21 (R5Q/R76E и R5E/R76A), наблюдали большие уровни воздействия, чем в случае родительских конструкций, представляющих собой слитый белок на основе гомодимера одинарного мутеина (R76E и R76A соответственно) (фигура 14; таблица 9).

Фармакодинамические (PD) параметры также тестировали *in vivo* на яванских макаках. Экспрессию PD-1 определяли с применением неконкурентного антитела к PD-1, и такой отбор проб PD-1 производили в день -5, день 7 и день 21. Животным давали первую дозу (i) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и гомодимер одинарного мутеина IL-21 R76E, (ii) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и мономер одинарного мутеина IL-21 R76E, или (iii) слитого белка, содержащего антитело mAb к PD-1 и двойной мутеин IL-21 R5Q/R76E, в день 1 и вторую дозу в день 8. См. фигуру 15A.

На фигурах 15B-15D показано кратное изменение соотношения PD-1-положительных/CD4-положительных клеток (относительно дня -5), измеренное в день 7 (фигура 15B), кратное изменение соотношения PD-1-положительных/CD8-положительных клеток (относительно дня -5), измеренное в день 7 (фигура 15C), и кратное изменение соотношения PD-1-положительных/CD8-положительных клеток (относительно дня -5), измеренное в день 21 (фигура 15D).

Как показано на фигурах 15B-15D, даже однократная доза слитого белка,



содержащего антитело mAb к PD-1 и двойной мутантный вариант IL-21, приводит к увеличению количества периферических PD-1+/CD8+Т-клеток. Это исследование продемонстрировало, что слитые белки на основе двойных мутантных вариантов способны обеспечивать существенное увеличение количества PD-1+ CD8 Т-клеток в большей степени, чем родительские варианты на основе одинарного мутеина.

PD биомаркеры также исследовали на предмет различий, и данные свидетельствуют о том, что мономерная конструкция характеризуется более низким уровнем охвата мишеней и PD-ответов при однократном введении дозы, но эквивалентными изменениями PD и уровня охвата мишеней при введении нескольких доз. Эти данные свидетельствуют о том, что РК-свойства слитых белков можно дополнительно улучшить с помощью мономерного формата.

Как показано на фигуре 16, занятость рецептора (RO) на CD8+ клетках обычно коррелирует с размножением PD-1+ CD8 Т-клеток в случае двойных мутантных вариантов (животные 803, 805, 806). Конструкции с гомодимером одинарного мутантного варианта (животные 801, 802) не способствовали увеличению количества PD-1+ CD8 Т-клеток, вероятно, ввиду их относительно слабо выраженных фармакокинетических свойств. Примечательно, что конструкции с двойным мутеином, которые обладают более желательными фармакокинетическими свойствами, способствовали увеличению количества PD-1+ CD8 Т-клеток, и PD-ответы коррелировали с уровнем охвата мишеней. Полученные данные свидетельствуют о том, что слитые белки на основе двойных мутантных вариантов могут способствовать увеличению количества соответствующей популяции Т-клеток, о которых известно, что они участвуют в защитном противоопухолевом иммунитете.

На фигуре 17 показано, что уровень охвата мишеней, представляющих собой PD-1, в CD8+ Т-клетках при повторном введении доз сходен с таковым, наблюдаемым в случае антитела mAb к PD-1 (данные для антител mAb к PD-1 не показаны). В совокупности, что касается двойных мутантных вариантов, фигуры 16 и 17 подтверждают идею о том, что модуляция популяции-мишени (PD-1+ CD8 Т-клетки) требует достаточного уровня охвата мишеней и что обеспечение улучшения в отношении уровня охвата мишеней коррелирует с улучшенными фармакодинамическими ответами.

#### ПРИМЕР 9

В данном примере продемонстрировано получение панели слитых белков, содержащих различные антитела mAb к PD-1, слитые с разнообразными гомодимерными двойными мутеинами IL-21.

Панель антител mAb к PD-1 была получена и протестирована, как описано в примере 12, и ведущие mAb были слиты с определенными двойными мутеинами IL-21. Двенадцать слитых белков, содержащих гомодимерные двойные мутеины IL-21 и антитела mAb к PD-1, тестировали в отношении активности IL-21 в Т-клетках Hut78 как PD-1<sup>-ve</sup>, так и PD-1<sup>+ve</sup> с применением анализа фосфорилирования STAT3, связывания IL-21R и связывания PD-1 с применением анализа с помощью Octet от ForteBio, активности PD-1 с применением

анализа репортерного гена PD-1 в линии Jurkat и активности *in vitro* с применением анализа MLR (реакция смешанной культуры лимфоцитов). Эти эксперименты были выполнены по сути, как описано в предыдущих примерах.

Список из двенадцати слитых белков, содержащих антитело mAb к PD-1 и двойной мутеин IL-21, и значения их активности, измеренные в этих анализах, представлены в таблицах 10-12.

ТАБЛИЦА 10

Активность IL-21, измеренная с помощью анализа фосфорилирования STAT3

| <b>Антитело<br/>mAb к PD-1</b> | <b>Аминокислотные<br/>замены в двойном<br/>мутеине IL-21</b> | <b>Hut78 (n1)<br/>PD-1<sup>+ve</sup>,<br/>EC50 (нМ)</b> | <b>Hut78 (n2)<br/>PD-1<sup>+ve</sup>,<br/>EC50 (нМ)</b> | <b>Hut78 (n1)<br/>PD-1<sup>-ve</sup>,<br/>EC50 (нМ)</b> | <b>Hut78 (n2)<br/>PD-1<sup>-ve</sup>,<br/>EC50 (нМ)</b> |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| A-1-003<br>(20A2.003)          | (R5A, R76E)                                                  | 7,55                                                    | 14,74                                                   | >1000                                                   | >1000                                                   |
| A-1-003<br>(20A2.003)          | (R5Q, R76E)                                                  | 3,37                                                    | 16,9                                                    | >1000                                                   | >1000                                                   |
| A-1-003<br>(20A2.003)          | (R5E, R76A)                                                  | 5,70                                                    | 25,07                                                   | 618,28                                                  | >1000                                                   |
| A-1-003<br>(20A2.003)          | (R9E, R76A)                                                  | 25,26                                                   | 59,10                                                   | >1000                                                   | >1000                                                   |
| A-4-006<br>(20C1.006)          | (R5A, R76E)                                                  | 7,40                                                    | 15,33                                                   | >1000                                                   | >1000                                                   |
| A-3-009<br>(20C1.009)          | (R5Q, R76E)                                                  | 3,75                                                    | 16,39                                                   | >1000                                                   | >1000                                                   |
| A-3-009<br>(20C1.009)          | (R5E, R76A)                                                  | 5,27                                                    | 10,71                                                   | 471,56                                                  | >1000                                                   |
| A-3-009<br>(20C1.009)          | (R9E, R76A)                                                  | 19,44                                                   | 56,43                                                   | >1000                                                   | >1000                                                   |
| A-2-006<br>(22D4.006)          | (R5A, R76E)                                                  | 6,90                                                    | 8,04                                                    | >1000                                                   | >1000                                                   |
| A-2-006<br>(22D4.006)          | (R5Q, R76E)                                                  | 4,45                                                    | 10,32                                                   | >1000                                                   | >1000                                                   |
| A-2-006<br>(22D4.006)          | (R5E, R76A)                                                  | 5,34                                                    | 13,11                                                   | 652,02                                                  | 826,11                                                  |

|                                             |             |       |       |       |       |
|---------------------------------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|
| A-2-006<br>(22D4.006)                       | (R9E, R76A) | 17,41 | 45,63 | >1000 | >1000 |
| rhIL-21(av)                                 | -           | 0,15  | 0,625 | 0,22  | 0,715 |
| Антитело<br>mAb к PD-1<br>(изотип IgG4)     |             | -     | -     | -     | -     |
| Антитело<br>mAb к PD-1<br>(изотип IgG1)     |             | -     | -     | -     | -     |
| 2-е антитело<br>mAb к PD-1<br>(изотип IgG4) |             | -     | -     | -     | -     |

ТАБЛИЦА 11

Связывание IL-21R и связывание PD-1

| Антитело<br>mAb к PD-1 | Аминокислотные<br>замены в двойном<br>мутеине IL-21 | IL-21R<br>чел., Kd<br>(нМ) | IL-21R<br>яв. макс.,<br>Kd (нМ) | hPD-1,<br>Kd (нМ) | CyPD-1,<br>Kd (нМ) |
|------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------|--------------------|
| A-1-003<br>(20A2.003)  | (R5A, R76E)                                         | >300                       | >300                            | 1,9               | 3,1                |
| A-1-003<br>(20A2.003)  | (R5Q, R76E)                                         | >300                       | >300                            | 2,4               | 2,6                |
| A-1-003<br>(20A2.003)  | (R5E, R76A)                                         | >300                       | >300                            | 4,4               | 4,7                |
| A-1-003<br>(20A2.003)  | (R9E, R76A)                                         | >300                       | >300                            | 1,5               | 3,3                |
| A-4-006<br>(20C1.006)  | (R5A, R76E)                                         | >300                       | >300                            | 0,8               | 1,6                |
| A-3-009<br>(20C1.009)  | (R5Q, R76E)                                         | >300                       | >300                            | 0,7               | 1,4                |
| A-3-009<br>(20C1.009)  | (R5E, R76A)                                         | >300                       | >300                            | 0,9               | 2,3                |
| A-3-009<br>(20C1.009)  | (R9E, R76A)                                         | >300                       | >300                            | 0,7               | 1,7                |
| A-2-006                | (R5A, R76E)                                         | >300                       | >300                            | 1,0               | 1,5                |

|                                             |             |       |        |     |     |
|---------------------------------------------|-------------|-------|--------|-----|-----|
| (22D4.006)                                  |             |       |        |     |     |
| A-2-006<br>(22D4.006)                       | (R5Q, R76E) | >300  | >300   | 1,2 | 1,4 |
| A-2-006<br>(22D4.006)                       | (R5E, R76A) | >300  | >300   | 1,2 | 1,0 |
| A-2-006<br>(22D4.006)                       | (R9E, R76A) | >300  | >300   | 1,3 | 1,3 |
| rhIL-21(av)                                 | -           | 0,038 | <0,010 | -   | -   |
| Антитело<br>mAb к PD-1<br>(изотип IgG4)     |             | -     | -      | ~9  | ~9  |
| Антитело<br>mAb к PD-1<br>(изотип IgG1)     |             | -     | -      | ~6  | ~4  |
| 2-е антитело<br>mAb к PD-1<br>(изотип IgG4) |             | -     | -      | 2,4 | 1,0 |

ТАБЛИЦА 12

Активность PD-1 и MLR

| <b>Антитело<br/>mAb к PD-1</b> | <b>Аминокислотные<br/>замены в двойном<br/>мутеине IL-21</b> | <b>Репортер<br/>hPD-1 N1<br/>(нМ)</b> | <b>Репортер<br/>hPD-1 N1<br/>(нМ)</b> | <b>MLR N1<br/>IL-2<br/>(нМ)</b> | <b>MLR N2<br/>IL-2<br/>(нМ)</b> |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| A-1-003<br>(20A2.003)          | (R5A, R76E)                                                  | 0,748                                 | 0,622                                 | 3,438                           | 2,198                           |
| A-1-003<br>(20A2.003)          | (R5Q, R76E)                                                  | 0,997                                 | 0,805                                 | 4,021                           | 1,821                           |
| A-1-003<br>(20A2.003)          | (R5E, R76A)                                                  | 0,344                                 | 0,47                                  | 2,472                           | 1,397                           |
| A-1-003<br>(20A2.003)          | (R9E, R76A)                                                  | 0,788                                 | 0,712                                 | 2,872                           | 1,252                           |
| A-4-006<br>(20C1.006)          | (R5A, R76E)                                                  | -                                     | -                                     | -                               | -                               |
| A-3-009<br>(20C1.009)          | (R5Q, R76E)                                                  | 0,472                                 | 0,738                                 | 1,04                            | 1,186                           |

|                                             |             |       |       |       |       |
|---------------------------------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|
| A-3-009<br>(20C1.009)                       | (R5E, R76A) | 0,445 | 0,46  | 0,345 | 0,77  |
| A-3-009<br>(20C1.009)                       | (R9E, R76A) | 0,669 | 0,409 | 1,191 | 0,68  |
| A-2-006<br>(22D4.006)                       | (R5A, R76E) | 0,331 | 0,269 | 0,469 | 0,88  |
| A-2-006<br>(22D4.006)                       | (R5Q, R76E) | 0,369 | 0,255 | 0,769 | 0,458 |
| A-2-006<br>(22D4.006)                       | (R5E, R76A) | 0,281 | 0,177 | 0,59  | 0,31  |
| A-2-006<br>(22D4.006)                       | (R9E, R76A) | 0,429 | 0,112 | 1,042 | 0,446 |
| rhIL-21(av)                                 | -           | -     | -     | -     | -     |
| Антитело<br>mAb к PD-1<br>(изотип IgG4)     |             | 1,915 | 2,905 | 1,354 | 3,216 |
| Антитело<br>mAb к PD-1<br>(изотип IgG1)     |             | -     | -     | -     | -     |
| 2-е антитело<br>mAb к PD-1<br>(изотип IgG4) |             | 0,555 | 0,695 | 0,627 | 0,708 |

Большинство, если не все кандидаты, показали такие же результаты, как и два антитела mAb к PD-1, или даже лучшие. Несколько из них продемонстрировали значения молярной активности в анализе активности PD-1 и MLR, которые были выше или равны значению молярной активности антитела mAb к PD-1.

Из 12 кандидатов два были отобраны для дальнейших исследований. Один из них содержал двойной мутеин IL-21, содержащий мутации R5Q/R76E, а второй содержал двойной мутеин IL-21, содержащий мутации R9E/R76A. Для получения слитого белка с одним из двух мутеинов IL-21 использовали различные антитела mAb к PD-1 из панели mAb к PD-1. В слитых белках с R5Q/R76E применяли десять антител mAb к PD-1, в том числе антитела mAb к PD-1, представляющие собой 20A2.003 (оранжевый ромб), 20C1.006 (красный квадрат), 20C1.009 (зеленый треугольник) и 22D4.006 (темно-фиолетовый круг). В слитых белках с R9E/R76A применяли семь антител mAb к PD-1, в том числе антитела mAb к PD-1, представляющие собой 20A2.003 (фиолетовый ромб), 20C1.006 (красный квадрат), 20C1.009 (зеленый треугольник) и 22D4.006 (черный круг). Слитые белки

тестировали в отношении активности IL-21 с применением анализа фосфорилирования STAT3, как по сути описано в данном документе. На фигурах 18А-18В и 19А-19В показаны значения активности в PD-1<sup>ve</sup> и PD-1<sup>ve</sup> Т-клетках линии HUT78 относительно сигналов rhIL-21 (ярко-розовая линия). Как показано на этих фигурах, слитые белки проявляли > 1000-кратное ослабление в PD-1<sup>ve</sup> Т-клетках линии HUT78, но сохраняли молярную активность в PD-1<sup>ve</sup> Т-клетках линии HUT78.

#### ПРИМЕР 10

В данном примере продемонстрировано получение панели слитых белков, содержащих различные антитела mAb к PD-1, слитые с разнообразными мономерными и гомодимерными двойными мутеинами IL-21.

Была получена панель слитых белков, содержащих антитело mAb к PD-1 и мономерный или гомодимерный двойной мутеин IL-21. Перечень слитых белков, содержащих антитело mAb к PD-1 и двойной мутеин IL-21, представлен в таблице 13.

ТАБЛИЦА 13

| Антитело mAb к PD-1           | Аминокислотные замены в двойном мутеине IL-21 | Мутеин IL-21: гомодимер или мономер | SEQ ID NO части слитого белка, представляющей собой мутеин IL-21 |
|-------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| A-2-006 V4 (22D4.006 V4)      | R5E/R76A                                      | Мономер                             | 238                                                              |
| A-2-006 V4 (22D4.006 V4)      | R9E/R76A                                      | Мономер                             | 244                                                              |
| A-2-006 V4 (22D4.006 V4)      | R5A/R76E                                      | Мономер                             | 237                                                              |
| A-2-006 V4 (22D4.006 V4)      | R5Q/R76E                                      | Мономер                             | 241                                                              |
| A-2-006 (22D4.006)            | R5E/R76A                                      | Гомодимер                           | 238                                                              |
| A-2-006 (22D4.006)            | R9E/R76A                                      | Гомодимер                           | 244                                                              |
| A-2-006 (22D4.006)            | R5A/R76E                                      | Гомодимер                           | 237                                                              |
| A-2-006 (22D4.006)            | R5Q/R76E                                      | Гомодимер                           | 241                                                              |
| A-2-006 V106 (22D4.006 V106)  | R5Q/R76E                                      | Мономер                             | 241                                                              |
| A-2-006 V112                  | R5Q/R76E                                      | Мономер                             | 241                                                              |
| A-2-006 V106 (22D4.006 V106)  | R9E/R76A                                      | Мономер                             | 244                                                              |
| A-2-006 V112 ((22D4.006 V112) | R9E/R76A                                      | Мономер                             | 244                                                              |
| A-1-003 V4 (20A2.003 V4)      | R5E/R76A                                      | Мономер                             | 238                                                              |
| A-1-003 V4 (20A2.003 V4)      | R9E/R76A                                      | Мономер                             | 244                                                              |

|                                          |          |           |     |
|------------------------------------------|----------|-----------|-----|
| A-1-003 V4 (20A2.003 V4)                 | R5A/R76E | Мономер   | 237 |
| A-1-003 V4 (20A2.003 V4)                 | R5Q/R76E | Мономер   | 241 |
| A-1-003 (20A2.003)                       | R5E/R76A | Гомодимер | 238 |
| A-1-003 (20A2.003)                       | R9E/R76A | Гомодимер | 244 |
| A-1-003 (20A2.003)                       | R5A/R76E | Гомодимер | 237 |
| A-1-003 (20A2.003)                       | R5Q/R76E | Гомодимер | 241 |
| A-1-003 V106 (20A2.003 V106)             | R5Q/R76E | Мономер   | 241 |
| A-1-003 V112 (20A2.003 V112)             | R5Q/R76E | Мономер   | 241 |
| A-1-003 V106 (20A2.003 V106)             | R9E/R76A | Мономер   | 244 |
| A-1-003 V112 (20A2.003 V112)             | R9E/R76A | Мономер   | 244 |
| rhIL-21(av)                              | -        |           |     |
| Антитело mAb к PD-1<br>(изотип IgG4)     |          |           |     |
| Антитело mAb к PD-1<br>(изотип IgG1)     |          |           |     |
| 2-е антитело mAb к PD-1<br>(изотип IgG4) |          |           |     |

Слитые белки тестировали в отношении активности IL-21 в Т-клетках Hut78 как PD-1<sup>-ve</sup>, так и PD-1<sup>+ve</sup> с применением анализа фосфорилирования STAT3, связывания IL-21R и связывания PD-1 с применением анализа с помощью Octet от ForteBio, активности PD-1 с применением анализа репортерного гена PD-1 в линии Jurkat и активности *in vitro* с применением анализа MLR. Эти эксперименты были выполнены по сути, как описано в предыдущих примерах. Значения активности, измеренные в этих анализах *in vitro*, показаны на фигурах 20-23.

На фигурах 20A-20D представлена величина передачи сигнала с помощью pSTAT3, наблюдаемая в случае нескольких продуктов слияния антитела mAb к PD-1 - мономерных или гомодимерных двойных мутеинов IL-21. Передача сигнала с помощью pSTAT3, стимулированная с помощью rhIL-21, показана красным цветом вверху графиков, в то время как передача сигнала с помощью pSTAT3, стимулированная с помощью контрольного IgG1, показана серым цветом (внизу графиков), а с помощью контрольного IgG2 показана оранжевым цветом (внизу графиков). Передача сигнала с помощью pSTAT3,

стимулированная с помощью антитела mAb к PD-1 (присутствующего в виде mAb, т. е. не в виде слитого белка), показана зеленым цветом (нижняя часть графиков). Передача сигнала с помощью pSTAT3, стимулированная контрольными антителами mAb к PD-1, показана оранжевым и желтым цветом (нижняя часть графиков), тогда как остальные линии представляют передачу сигнала с помощью pSTAT3, достигнутую при стимуляции с помощью продуктов слияния антитела mAb к PD-1 - мономерных или димерных двойных мутеинов IL-21 (с различными мутациями с заменой пар заряженных аминокислот), где двойные мутантные варианты представляют собой мутантные варианты с R5E/R76A, R9E/R76A, R5A/R76E или R5Q/R76E. Как показано на этом наборе фигур, rhIL-21 демонстрирует активность как в клетках PD-1<sup>-ve</sup>, так и в клетках PD-1<sup>+ve</sup>. Напротив, продукты слияния на основе мономерных и гомодимерных двойных мутеинов способны демонстрировать активность в отношении pSTAT3 (на основе IL-21) только в клетках PD-1<sup>+ve</sup>, но не в клетках PD-1<sup>-ve</sup>. Таким образом, мономерные продукты слияния на основе двойных мутантных вариантов IL-21 демонстрируют уровни ослабления активности IL-21 в клетках PD-1<sup>-ve</sup> и сохранения активности IL-21 в клетках PD-1<sup>+ve</sup>, сходные с соответствующими им димерными продуктами слияния.

Слитые белки, оцененные на фигурах 20A-20D, тестировали в анализе репортерного гена PD-1 (RGA; фигуры 21A и 21B) и анализе MLR (фигуры 21C и 21D). Результаты, показанные на фигурах 21A-21D, демонстрируют, что продукты слияния антитела mAb к PD-1 - мономерных и димерных двойных мутеинов IL-21 способны индуцировать активность PD-1.

Результаты анализов pSTAT3, в которых тестируют такие же конструкции, представляющие собой продукты слияния антитела mAb к PD-1 - мономерного и димерного двойного мутеина IL-21, что и на фигурах 20A-20D, за исключением того, что антитело mAb к PD-1 является другим, показаны на фигурах 22A-22D. Результаты на фигурах 22A-22D аналогичны результатам, наблюдаемым на фигурах 20A-20D.

Результаты анализов репортерного гена PD-1 и MLR, в которых тестируют конструкции, представляющие собой продукт слияния антитела mAb к PD-1 - мономерного и димерного двойного мутеина IL-21, аналогичные таковым и на фигурах 21A-21D, за исключением того, что отличается антитело mAb к PD-1, показаны на фигурах 23A-23D.

Эти данные демонстрируют, что слитый белок, содержащий двойной мутеин IL-21, может не требовать конфигурации гомодимера для частичного ослабления. Следующие двойные мутеины (слитые в виде мономеров или гомодимеров с антителом mAb к PD-1 (таблица 14)) были отобраны для дальнейшей оценки.

ТАБЛИЦА 14

| .                  | Мутеин IL-21 | Формат     |
|--------------------|--------------|------------|
| A-2-017 (22D4.017) | R5Q:R76E     | Гомодимер  |
| A-2-017 (22D4.017) | R5Q:R76E     | Мономер V1 |
| A-2-017 (22D4.017) | R9E:R76A     | Гомодимер  |



|                    |          |            |
|--------------------|----------|------------|
| A-2-017 (22D4.017) | R9E:R76A | Мономер V1 |
|--------------------|----------|------------|

Данные, основанные на клеточном анализе, свидетельствуют о том, что эти мутеины при слиянии с антителом к PD-1 могут избирательно нацеливаться на Т-клетки (продемонстрировано с применением линий Т-клеток), экспрессирующие рецептор PD-1. Эти бифункциональные молекулы PD-1 x IL-21 обладают уникальными свойствами, приобретенными от каждого плеча молекулы слияния (антитела mAb к PD-1 и мутеина IL-21).

#### ПРИМЕР 11

В примерах применяли следующие материалы и способы.

##### *Получение продуктов слияния антитело Ab к PD-1 - мутеин IL-21*

Последовательности рекомбинантного антитела Ab к PD-1 - мутеина IL-21 клонировали в pTT5 для временной экспрессии в HEK293-6E или в векторе, содержащем кассету для отбора с помощью антибиотика, для стабильной экспрессии в клетках CHO-K1. Выработку с целью экспрессии проводили в течение 5-7 дней при 36°C, и надосадочную жидкость собирали для очистки. Все партии белка очищали с помощью аффинной хроматографии на основе связывания с белком A (Mab Select SuRe) с последующим катионным обменом (SP-сефароза HP) и заменой буфера (UF/DF) в буфере A5.2Su. При исследовании с помощью эксклюзионной хроматографии все партии характеризовались содержанием основного пика, составляющим > 95%, при содержании эндотоксина, составляющем <0,2 ЕЭ/мг (LAL Endosafe, Charles River).

##### *Анализы репортерного гена PD-1 в линии Jurkat*

Стабильные эффекторные клетки линии Jurkat NFAT-*luc2*/PD-1 от GloResponse (Promega, № CS187102) и линию клеток CHO, стабильно экспрессирующую PD-L1 (Promega, № CS178103), совместно культивировали в соотношении 1,25:1 в присутствии серийно разведенных антител в трех повторностях в течение 6 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Уровень люминесценции измеряли с применением системы для анализа люциферазы Bio-Glo (Promega, № G7940).

##### *Анализ фосфорилирования STAT3*

*pSTAT3 AlphaScreen.* Затем родительские клетки линии HuT 78 и клетки линии HuT 78, стабильно экспрессирующие PD-1, высевали на отдельные планшеты при концентрации 40000 клеток на лунку в присутствии серийно разведенных антител в трех повторностях в течение 40 минут при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Уровни Pstat3 Tyr705 измеряли с применением набора для анализа AlphaLISA Surefire Ultra Pstat3 (Tyr705) (Perkin Elmer, № ALSU-PST3-A10K).

*Анализ HTRF фосфорилированного STAT3.* Клетки подвергали "сывороточному голоданию" в течение ночи в среде RPMI 1860 с добавлением 1% L-глутамина (HyClone кат. № SH30034.01). Затем клетки ресуспендировали в сбалансированном солевом растворе Хенкса без фенолового красного без кальция и магния (HBSS; ThermoFisher кат. №14175095) при концентрации 2,5×10<sup>6</sup> клеток/мл и высевали на 384-луночный белый планшет малого объема (Perkin Elmer кат. № 6008289) по 8 мкл/лунка. Затем клетки стимулировали с помощью молекул мутеина IL-21, разведенных в HBSS, в количестве 4

мкл/лунка при 37°C в течение 40 минут. Фосфорилирование STAT3 обнаруживали с применением набора для анализа HTRF® фосфорилированного STAT3 (Tyr705) в соответствии с рекомендацией производителя (Cisbio кат. № 64NT3PEH). Сигнал FRET в анализе обнаруживали с применением многоканального планшет-ридера EnVision (Perkin Elmer). Данные анализировали посредством того, что сначала определяли соотношение HTRF в соответствии с рекомендациями Cisbio, а затем вычисляли кратность изменения по сравнению с фоновыми значениями, применяя данные, полученные из анализа нестимулированных клеток. Для каждого эксперимента строили кривые дозовой зависимости, и молярную активность данной молекулы представляли в виде концентрации, при которой наблюдается определенная кратность по сравнению с фоновым значением.

#### *Реакция смешанной культуры лимфоцитов (MLR)*

Лейкопаки от пар несовместимых доноров получали от AllCells Inc. Донорские Т-клетки выделяли с применением набора для выделения пан-Т-клеток (Miltenyi Biotec, № 130-096-535), и моноциты от разных доноров выделяли с применением набора для выделения пан-Т-клеток (Miltenyi Biotec, № 130-096-537). Обеспечивали дальнейшее созревание моноцитов в течение 10 дней с применением набора для дифференциации дендритных клеток, полученных из моноцитов человека, CellXVivo (R&D Systems, № CDK004). Пан-Т-клетки совместно культивировали со зрелыми моноцитами в соотношении 10:1 в присутствии серийно разведенных антител в трех повторностях в течение 72 часов при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Уровни IL-2 в надосадочной жидкости измеряли с помощью ELISA (MesoScale Discoveries, № K151QQD-4).

#### *Анализы связывания IL-21R и PD-1*

**Аффинность связывания IL-21R человека и яванского макака.** Тестировали рекомбинантные реагенты, представляющие собой как моновалентные IL-21R-FLAG-His, так и бивалентные IL-21R-Fc, однако для них были получены очень сходные результаты (отличающиеся в пределах ~ 2-3 раз). Реагенты, представляющие собой рекомбинантные растворимые IL-21R, минимально биотинилировали и захватывали на наконечниках со стрептавидином SAX до уровня нагрузки 2,0 нм. Затем наконечники инкубировали в лунках, где образцы антитела к PD-1-IL-21 были 3-кратно серийно разведены. Для продуктов слияния на основе IL-21 дикого типа максимальная концентрация образца составляла 10 нМ, тогда как для продуктов слияния на основе мутеина IL-21 максимальная концентрация образца составляла 300 нМ. Время ассоциации 20 минут и время диссоциации 1,5 часа применяли для максимального увеличения кривизны на графиках связывания для получения точных аппроксимирующих кинетических кривых.

**Аффинность связывания PD-1 человека и яванского макака.** Аффинность связывания PD-1 человека и яванского макака тестировали посредством того, что сначала захватывали образцы антитела к PD-1-IL-21 посредством иммобилизации по аминокислоте EDC-NHS к наконечникам AR2G; загрузку образца, как правило, осуществляли при pH 6 в течение 2000 секунд с последующим гашением посредством 1 М этаноламина для иммобилизации по меньшей мере на уровне 2 нм. После того как образцы были

иммобилизованы, наконечники затем инкубировали в лунках, содержащих 3-кратное последовательное разведение растворимых рекомбинантных рецепторов человека PD-1(1-170)-FLAG-His или яванского макака PD-1(1-167)-FLAG-His. В обоих случаях максимальная концентрация PD-1 составляла 30 нМ. Применяли ассоциацию в течение 300 секунд и диссоциацию в течение 500 секунд, поскольку они обеспечивали получение достаточной кривизны для получения точных аппроксимирующих кинетических кривых.

Указанные выше значения аффинности связывания IL-21R человека/яванского макака и PD-1 человека/яванского макака количественно определяли с помощью приборов Octet HTX и RED384 от ForteBio. Во всех случаях стандартный буфер для образцов Octet применяли для разбавления образца и для всех стадий связывания - исходной, ассоциации и диссоциации (10 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,10 мг/мл BSA, 0,13% (об./об.) Triton X-100).

Все исходные данные, полученные с помощью ForteBio, обрабатывали с применением стандартного программного обеспечения для анализа показаний прибора (v9 и v10) следующим образом: (а) две кривые эталонных наконечников, в которых была иммобилизована мишень, но отсутствовало взаимодействие (т. е. присутствовал только буфер), усредняли и вычитали из кривых остальных наконечников с образцом в том же столбце; (b) кривые ассоциации и диссоциации выделяли и выравнивали по оси Y; (c) осуществляли выравнивание между стадиями ассоциации и диссоциации; (d) применяли фильтрацию Савицкого-Голая для уменьшения отношения сигнал-шум; и (e) результирующий набор кривых ассоциации и диссоциации для каждого взаимодействия образец-мишень в целом аппроксимировали по одной модели связывания 1:1 для определения измеряемых значений константы скорости ассоциации  $k_a$  и константы скорости диссоциации  $k_d$ ; равновесную константу диссоциации  $K_D$  рассчитывали в виде соотношения констант скоростей диссоциации и ассоциации ( $= k_d/k_a$ ).

#### ПРИМЕР 12

В этом примере описано получение антител mAb к PD-1 для применения в слитых белках, содержащих мутеины IL-21.

##### Получение иммунных ответов с выработкой антител к PD-1

##### Линии мышей

Полностью человеческие антитела к PD-1 человека получали путем иммунизации трансгенных мышей XENOMOUSE® (патенты США №№ 6114598; 6162963; 6833268; 7049426; 7064244, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте; Green et al., 1994, *Nature Genetics* 7:13-21; Mendez et al., 1997, *Nature Genetics* 15:146-156; Green и Jakobovits, 1998, *J. Ex. Med*, 188:483-495; Kellerman и Green, *Current Opinion in Biotechnology* 13, 593-597, 2002). Для этих иммунизаций применяли животных из линий XMG4-K и XMG4-KL XENOMOUSE®.

##### Иммунизации

Для получения иммунных ответов с выработкой антител к PD-1 человека применяли путь иммунизации на основе клеток. Клетки CHO-S временно трансфицировали либо с

помощью PD-1 человека, слитого с помощью линкера Gly-Ser-Ser с меткой E3K-эпитопа Т-клеток, либо PD-1 яванского макака в качестве источника иммуногена. Животных иммунизировали с помощью любой из этих временно трансфицированных клеток CHO в смеси квасцов с CpG-ODN, 13 раз в течение 8 недель с применением ТПР-инъекции (в основание хвоста и внутрибрюшинно). Начальное бустерное введение состояло из 4 миллионов клеток, экспрессирующих PD-1 человека, в то время как последующие бустерные введения содержали по 2 миллиона клеток, экспрессирующих PD-1 человека или яванского макака. Всего было проведено 9 иммунизаций с помощью PD-1 человека (1-6, 8, 10 и 13), а остальные 4 иммунизации были выполнены с помощью PD-1 яванского макака. После 10-го бустерного введения у животных брали кровь для оценки титров PD-1-специфических антител.

Титры PD-1-специфичных антител в сыворотке крови отслеживали с помощью анализа FACS живых клеток на проточном цитометре Accuri. Вкратце, клетки линии HEK293 подвергали ложной трансфекции или временной трансфекции с помощью либо PD-1 человека, либо PD-1 яванского макака. Образцы сыворотки крови от иммунизированных животных разводили в 100 раз и инкубировали на трансфицированных клетках в течение 1 часа на льду. Затем клетки промывали для удаления несвязанных антител, и вторичное антитело, специфичное к Fc человека, меченное с помощью Cy5, инкубировали на клетках в течение дополнительных 15 минут при 4 градусах. Клетки промывали один раз для удаления несвязанного вторичного антитела, и флуоресцентный сигнал на клетках количественно определяли с помощью FACS. Животных с наивысшими титрами антиген-специфических нативных антител в сыворотке крови, направленных против PD-1 человека и яванского макака, применяли для получения гибридомы (Kohler и Milstein, 1975).

| Иммуноген                                                                   | Адьювант       | Линия | Сбор   |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------|-------|--------|
| PD-1 человека или PD-1 яванского макака, временно трансфицированные в CHO-S | Квасцы+CpG ODN | G4K   | 4 мыши |
|                                                                             |                | G4KL  | 4 мыши |

#### Получение моноклональных антител

##### Получение гибридомы

Животных, проявляющих подходящие титры в сыворотке крови, идентифицировали, и получали лимфоциты из селезенки и/или дренирующих лимфатических узлов. Объединенные лимфоциты (из каждого сбора) отделяли от лимфоидной ткани путем измельчения в подходящей среде (например, модифицированной по Дульбекко среде Игла (DMEM); Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). В-клетки отбирали и/или обеспечивали увеличение их количества с применением стандартных способов, и сливали с подходящим партнером по слиянию, с применением методик, которые были известны из уровня техники.

##### *Получение препарата мембраны*

Трансфекцию 20 миллионов клеток линии 293Т осуществляли с помощью рTT5-mini4:huPD-1::GSS:E3K с применением реагента для трансфекции 293fectin™ (Thermo Fisher, кат.: 12347019). Через 24 часа после трансфекции клетки линии 293Т биотинилировали путем инкубирования в PBS с pH 8,6, содержащем NHS-LC-LC-биотин EZ-Link™ (Thermo Fisher кат.: 21343) при 400 мкг/мл в течение 30 минут. Затем клетки промывали в PBS с нейтральным pH и затем ресуспендировали в гипотоническом буфере, содержащем ингибитор протеазы без EDTA и 10% Triton X100. Клетки разрушали путем их многократного нагнетания через шприц с иглой калибра 26. Фрагменты клеток осаждали путем центрифугирования при 12000 g в течение 20 минут. Затем надосадочную жидкость, содержащую частицы мембраны, собирали и промывали 3 раза с помощью PBS в центрифужной колонке Amicon Ultracel 100k (Millipore, кат. № UFC810024) для удаления детергента. Препараты мембран затем тестировали на отслеживание попаданий (клетки гибридомы положительного контроля со специфичностью к PD-1) для проверки коррелирующего с IgG связывания препарата мембраны. Препарат мембраны затем разделяли на аликвоты и замораживали при -20 градусах Цельсия до применения.

#### *Антиген-специфическое окрашивание клеток гибридомы*

Клетки гибридомы извлекали из колбы и промывали в стерильном буфере для FACS (PBS с 2% FBS). Затем клетки смешивали с препаратом мембраны, содержащей PD-1 (разбавленным 1:10 в буфере для FACS, для объема реакционной смеси 1 мл, например, 100 мкл препарата мембраны в 900 мкл буфера для FACS), и инкубировали при 4 градусах Цельсия в течение 1 часа. Клетки снова промывали в буфере для FACS и окрашивали с помощью 1 мл смеси для детектирования, содержащей 5 мкг/мл F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента антитела козы к Fc IgG человека, конъюгированного с Alexa Fluor 488 (Jackson, кат.: 109-546-098), и стрептавидина, конъюгированного с Alexa Fluor 647 (Jackson, кат.: 016-600-084), затем инкубировали при 4 градусах Цельсия в течение 30 минут в темноте. Клетки снова промывали в буфере для FACS, ресуспендировали в среде и затем пропускали через сито для клеток с размером отверстий 40 микрон для удаления агрегированных клеток. Антиген-специфические клетки сортировали с применением BD FACSAria 3 путем гейтирования по популяции, проявляющей как флуоресценцию, обусловленную Alexa Fluor 488, так и флуоресценцию, обусловленную Alexa Fluor 647 (IgG<sup>+</sup> и антигенсвязывающие клетки).

Сортированные клетки оставляли для культивирования на несколько дней в среде для гибридомы. Небольшой образец обогащенных клеток извлекали и тестировали на связывание с препаратом мембраны, содержащей PD-1, применяя те же условия окрашивания, как упомянуто выше. После подтверждения успешного обогащения PD-1-специфических клеток, клетки гибридомы затем сортировали по отдельным клеткам в 384-луночные планшеты для микротитрования с применением BD FACSAria 3. Через 2 недели культивирования из планшетов для микротитрования собирали образцы надосадочной жидкости и осуществляли их скрининг на связывание с PD-1.

#### *Начальный отбор антител, специфически связывающих PD-1*

Истощенные образцы надосадочной жидкости культуры гибридомы тестировали на

связывание с PD-1 человека, временно экспрессируемым в клетках линии HEK293, посредством Cell Insight. Вкратце, клетки линии HEK293 временно трансфицировали с помощью конструкции для экспрессии в клетках млекопитающих, кодирующей PD-1, с применением 293Fectin. На следующий день 15 мкл истощенной среды для гибридомы добавляли в каждую лунку 384-луночного планшета FMAT. Затем смешивали трансфицированные клетки линии HEK293 (0,27 млн./мл), ядерный краситель Hoechst 33342 (7,5 мкг/мл) и вторичное детекторное антитело (0,75 мкг/мл - антитело козы к IgG человека (H+L) Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch)), и 30 мкл этой смеси добавляли в каждую лунку 384-луночного планшета FMAT. Через ~ 3 часа надосадочную жидкость аспирировали с применением планшет-ридера AquaMax, и 30 мкл буфера для FACS добавляли в каждую лунку с применением многоканального прибора. Планшеты помещали на встряхиватель для планшетов Big Bear для обеспечения равномерного распределения клеток в лунке, и затем считывали на платформе Cell Insight с применением Cell Health Bio-App. Этот анализ привел к идентификации 383 антиген-специфических антител в этом сборе.

#### *Анализ PD-1 человека по репортеру NFAT-люцифераза в линии Jurkat*

Клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие PD-1 человека и репортер NFAT-люциферазу (Promega), культивировали в среде RPMI 1640 (Sigma) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma), 2 mM L-глутамина (Sigma), 10 mM HEPES (Hyclone, GE Healthcare Life Sciences), 500 мкг/мл генетицина (Gibco Life Technologies), 100 мкг/мл гигромицина В (Invitrogen) при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие PD-1 яванского макака и репортер NFAT-люциферазу (Promega), культивировали в среде RPMI 1640 (Sigma), с добавлением 10% фетальной бычьей сывороткой (Sigma), 2 mM L-глутамина (Sigma), 10 mM HEPES (Hyclone, GE Healthcare Life Sciences), 200 мкг/мл гигромицина В (Invitrogen), 300 мкг/мл зеоцина (Invitrogen) при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Клональную линию клеток 99 яичника китайского хомячка (CHO), стабильно экспрессирующую PD-L1 человека (Promega), культивировали в питательной смеси F12 HAM (Sigma), 10% фетальной бычьей сыворотки, 10 mM HEPES, 250 мкг/мл генетицина, 200 мкг/мл гигромицина В при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. В день эксперимента клетки линии Jurkat, экспрессирующие NFAT-люциферазу/PD-1, и клетки клона 99 линии CHO, экспрессирующие PD-L1 (отделенные с помощью трипсина), центрифугировали при 200 g в течение 5 минут и ресуспендировали в среде для анализа (среда RPMI 1640, 2% фетальная бычья сыворотка, 15 mM HEPES). Тестируемые молекулы разбавляли и титровали с применением буфера для анализа в 384-луночных планшетах для анализа с черным/прозрачным дном (Corning). Подготовленные клетки высевали в общем количестве 40000 клеток/лунка посредством того, что сначала смешивали подготовленные клетки в соотношении 1:1, а затем добавляли смесь клеток в планшеты для анализа. Планшеты инкубировали в течение 18-24 часов при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Количество полученной люциферазы измеряли с помощью реагента из системы для анализа люциферазы Bio-Glo (Promega), после чего планшеты инкубировали в течение 20 минут при комнатной

температуре и обнаруживали люминесценцию с помощью планшет-ридера EnVision (PerkinElmer). В случае одноточечного анализа образцы ESN сначала количественно оценивали, нормализовали и тестировали при концентрации 0,5 мкг/мл. Для определения молярной активности осуществляли серийное 3-кратное титрование образцов ESN или очищенных антител в среде для анализа и применяли их для обработки клеток, экспрессирующих репортер PD-1 человека или яванского макака. Количество антител, проявляющих необходимую активность во время скрининга по одной концентрации и ранжирования молярной активности, показано в таблице 15.

ТАБЛИЦА 15

| Одна точка | Ранжирование молярной активности | Уникальные последовательности |
|------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 86/383     | 12/86                            | 4/12                          |

Активность очищенных антител к PD-1 (n=1 для показанного анализа PD-1 человека) показана на фигуре 24, а значения молярной активности очищенных антител к PD-1, полученные в анализах репортера PD-1 человека и яванского макака перечислены в таблице 16.

ТАБЛИЦА 16

| ID Ab      | Молярная активность (нМ) |                    |                            |                            |
|------------|--------------------------|--------------------|----------------------------|----------------------------|
|            | PD-1 человека, n=1       | PD-1 человека, n=2 | PD-1 яванского макака, n=1 | PD-1 яванского макака, n=2 |
| A-1 (20A2) | 3,10                     | 1,27               | 2,34                       | ND                         |
| A-3 (20C1) | 5,51                     | 1,88               | 5,17                       | 4,16                       |
| A-2 (22D4) | 2,43                     | 0,71               | 2,72                       | 2,89                       |

### *Молекулярное восстановление и секвенирование антагонистических антител к PD-1*

РНК (суммарную или мРНК) очищали из лунок, содержащих клетки гибридомы, продуцирующие антагонистические антитела к PD-1, с применением набора Qiagen RNeasy mini или набора Invitrogen mRNA catcher plus. Очищенную РНК применяли для амплификации генов варибельной области (V) тяжелой и легкой цепей антитела с применением синтеза кДНК посредством обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (RT-PCR). Тяжелую цепь гамма полностью человеческого антитела получали с применением набора для одностадийной ПЦР с применением обратной транскриптазы Qiagen (Qiagen). Этот способ применяли для получения кДНК первой цепи из матрицы РНК, а затем для амплификации варибельной области тяжелой цепи гамма с применением мультиплексной ПЦР. Праймер, специфический к 5'-концу цепи гамма, отжигался с сигнальной последовательностью тяжелой цепи антитела, тогда как 3'-концевой праймер отжигался с областью константного домена цепи гамма. Полностью

человеческую легкую цепь каппа получали с применением набора для одностадийной ПЦР с применением обратной транскриптазы Qiagen (Qiagen). Этот способ применяли для получения кДНК первой цепи из матрицы РНК, а затем для амплификации вариабельной области легкой цепи каппа с применением мультиплексной ПЦР. Праймер, специфический к 5'-концу легкой цепи каппа, отжигался с сигнальной последовательностью легкой цепи антитела, тогда как 3'-концевой праймер отжигался с областью константного домена цепи каппа. Полностью человеческую легкую цепь лямбда получали с применением набора для одностадийной ПЦР с применением обратной транскриптазы Qiagen (Qiagen). Этот способ применяли для получения кДНК первой цепи из матрицы РНК, а затем для амплификации вариабельной области легкой цепи лямбда с применением мультиплексной ПЦР. Праймер, специфический к 5'-концу легкой цепи лямбда, отжигался с сигнальной последовательностью легкой цепи, тогда как 3'-концевой праймер отжигался с областью константного домена цепи лямбда.

Амплифицированную кДНК очищали с помощью ферментов с применением экзонуклеазы I и щелочной фосфатазы, и последовательность очищенного продукта ПЦР определяли прямым секвенированием. Аминокислотные последовательности выводили из соответствующих последовательностей нуклеиновой кислоты с помощью методов биоинформатики. Для каждого образца гибридомы выполняли по два дополнительных независимых цикла амплификации с помощью RT-PCR и секвенирования, чтобы подтвердить то, что любые наблюдаемые мутации не являлись следствием ПЦР. Затем полученные аминокислотные последовательности анализируют для определения исходной последовательности зародышевой линии антител и для идентификации отклонений от последовательности зародышевой линии. Приведено сравнение каждой из последовательностей тяжелой и легкой цепей с их исходными последовательностями зародышевой линии. Аминокислотные последовательности, соответствующие областям, определяющим комплементарность (CDR), секвенированных антител, выравнивали, и результаты такого выравнивания применяли для группировки клонов по сходству.

#### *Анализ связывания первичных клеток*

Связывание образцов надосадочной жидкости культуры гибридомы с PD-1, экспрессируемым первичными клетками человека и яванского макака, тестировали с помощью проточной цитометрии. Для анализа связывания первичных клеток человека очищенные Т-клетки человека (Biological Specialty Corp.) оттаивали и суспендировали при концентрации  $2,5 \times 10^6$  клеток/мл. Т-клетки стимулировали с помощью 5 мкг/мл клон ОКТ3 антитела к CD3 человека, (eBioscience) и 1 мкг/мл антитела к CD28 человека (BD Pharmingen) в течение 72 часов при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в планшете, который был предварительно покрыт с помощью 5 мкг/мл антитела к Fc IgG мыши (Pierce). Через 72 часа клетки удаляли, промывали и суспендировали при концентрации  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл с 10 нг/мл IL-2 (Pepro Tech). Затем клетки инкубировали в течение еще 48 часов при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. Для анализа связывания первичных клеток яванского макака PBMC яванского макака (SNBL) оттаивали и суспендировали при концентрации от  $4 \times 10^6$  до  $5 \times 10^6$  клеток/мл. PBMC стимулировали с



помощью 1 мкг/мл клона SP34 антитела к CD3 человека (BD Pharmingen) и 1 мкг/мл антитела к CD28 человека (BD Pharmingen) в течение 72 часов при 37°C/5% CO<sub>2</sub> в планшете, который был предварительно покрыт с помощью 5 мкг/мл антитела к Fc IgG мыши (Pierce). Через 72 часа клетки удаляли, промывали и суспендировали при концентрации  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл с 20 нг/мл IL-2 (Pepro Tech). Затем клетки инкубировали в течение еще 48 часов при 37°C/5% CO<sub>2</sub>. После заключительного инкубирования клетки подготавливали для проточной цитометрии путем инкубирования с нормализованными образцами надосадочной жидкости культуры гибридомы, антителами положительного контроля и антителами изотипического контроля при конечной концентрации 1 мкг/мл. F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент антитела козы к IgG человека (H+L) с Alexa Fluor 647 AffiniPure (Jackson ImmunoResearch) при 5 мкг/мл применяли для обнаружения с помощью вторичного антитела, а 8,25 нМ YoPro1 (Invitrogen) применяли для окрашивания на присутствие живых и мертвых клеток. Затем клетки анализировали на проточном цитометре BD FACSCanto II для выявления связывания антитела к PD-1. Результаты выражены в виде геометрического среднего для клеток, экспрессирующих PD-1, по данным FACS, и данные приведены в таблице 17.

ТАБЛИЦА 17

| <b>ID антитела</b> | <b>Первичные клетки яванского макака (геометрическое среднее по FACS)</b> | <b>Первичные клетки человека (геометрическое среднее по FACS)</b> |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| A-1 (20A2)         | 194                                                                       | 326                                                               |
| A-3 (20C1)         | 187                                                                       | 312                                                               |
| A-2 (22D4)         | 188                                                                       | 329                                                               |

*Анализ конкурентного связывания рецептор-лиганд*

Затем образцы надосадочной жидкости культуры гибридомы, связывающиеся с PD-1, тестировали в отношении их способности блокировать PD-1 от связывающего лиганда. Анализ конкурентного связывания проводили на образцах надосадочной жидкости культуры антиген-специфической гибридомы с применением FACS на клетках линии НЕК293, временно экспрессирующих PD-1 человека, следующим образом. Клетки линии НЕК293, экспрессирующие PD-1 человека, смешивали с образцом антител (образцы надосадочной жидкости культуры гибридомы, специфичные к PD-1) и инкубировали в течение 1 часа при 4°C, а затем дважды промывали. Затем клетки со связанным образцом инкубировали с huPD-L1-Fc-Alexa647 или huPD-L2-Fc-Alexa 647 (R&D systems, Миннеаполис, Миннесота) в течение 45 минут при 4°C. Затем добавляли краситель для оценки жизнеспособности клеток 7-AAD и клетки инкубировали в течение дополнительных 15 минут при 4°C, дважды промывали и ресуспендировали в буфере для FACS. Образцы анализировали с применением проточного цитометра BD Accuri™ и автоматического пробоотборника Intellicyt HyperCyt. Данные в таблице 18 отражают процент ингибирования связывания PD-L1 или PD-L2 человека с PD-1 человека при

концентрации 1 мкг/мл.

ТАБЛИЦА 18

Конкурентный анализ связывания антител к PD-1 с PD-L1 или связывания PD-L2 с PD-1

| ID антитела | R-L PD-L1 (% ингибирования) | R-L PD-L2 (% ингибирования) |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|
| A-1 (20A2)  | 72%                         | 71%                         |
| A-3 (20C1)  | 64%                         | 65%                         |
| A-2 (22D4)  | 71%                         | 72%                         |

*Анализ различия аффинности*

Измерения кинетических параметров нескольких антител оценивали с применением способа KinExA®. Этот способ включает определение формальных измеренных значений аффинности на основании раствора при равновесии.

Гранулы поли(метилметакрилата) или PMMA покрывали биотинилированным PD-1 человека, с первоначальным покрытием посредством адсорбции гранул PMMA биотинилированным BSA, нейтравидином и затем биотинилированным PD-1.

Эксперименты KinExA проводили с применением автоматизированной системы для проточного иммунологического анализа, KinExA 3200, в которой гранулы, связанные с PD-1, служили в качестве твердой фазы. Вкратце, постоянное количество антител mAb к hPD-1 (3 нМ, или 1 нМ, или 100 пМ) инкубировали с концентрациями титрованного h-PD-1 или су-PD-1, начиная с 100 нМ, в буфере для образцов (PBS с 0,1% BSA для уменьшения неспецифического связывания). Комплексы антиген/антитело инкубировали при к. т. в течение от 48 часов до 72 часов для обеспечения достижения равновесия. Смесь пропускали через гранулы, связанные с PD-1, для накопления несвязанного антитела. Объемы и скорости потока смеси варьировали в зависимости от конкретного сигнала, полученного в каждом эксперименте.

Захваченное mAb выявляли с применением растворов, содержащих вторичное антитело, представляющее собой антитело козы к IgG чел. (H+L)-Alexa647 в буфере для образцов. Сигналы связывания преобразовывали в относительные значения в виде доли от контроля в отсутствие hu- или су-PD-1. Две повторности каждого образца измеряли для всех равновесных экспериментов. Равновесную константу диссоциации (Kd) получали из нелинейного регрессионного анализа данных с применением модели гомогенного связывания с одним участком, содержащейся в программном обеспечении для анализа п-кривой KinExA. Посредством программного обеспечения рассчитывали Kd и определяли 95% доверительный интервал, осуществляя аппроксимирование точек данных к теоретической кривой Kd. 95% доверительный интервал задан в виде низкого значения Kd и высокого значения Kd.

ТАБЛИЦА 19

Аффинность очищенных антител к PD-1 в отношении рекомбинантного PD-1 человека и яванского макака

| ID mAb     | Аффинность в отношении PD-1 человека |             |                 | Аффинность в отношении PD-1 яванского макака |             |                 |                                        |
|------------|--------------------------------------|-------------|-----------------|----------------------------------------------|-------------|-----------------|----------------------------------------|
|            | KD (пМ)                              | 95% CI (пМ) | % активного mAb | KD (пМ)                                      | 95% CI (пМ) | % активного mAb | Кратность уровня отличия чел.:яв. мак. |
| A-1 (20A2) | 17                                   | 13-23       | 25              | 15                                           | 12-19       | 21              | 0,9                                    |
| A-3 (20C1) | 16                                   | 13-21       | 17              | 60                                           | 52-68       | 18              | 3,8                                    |
| A-2 (22D4) | 4,5                                  | 3,6-5,5     | 27              | 3,7                                          | 2,7-4,8     | 23              | 0,8                                    |

*Kd* рассчитывали, принимая концентрацию PD-1 в качестве известной концентрации и обеспечивая расчет *Kd* и концентрации mAb с помощью программного обеспечения.

#### *Подтверждение активности очищенных антител в анализе MLR*

Незрелые дендритные клетки, полученные из моноцитов человека (Astarte), оттаивали и дифференцировали в зрелые дендритные клетки посредством культивирования в IL-4, GM-CSF и TNF-α в течение 72 часов с применением набора для дифференцировки дендритных клеток, полученных из моноцитов человека CellXVivo (R&D Systems № CDK004). Неадгезивные и слабо адгезивные клетки удаляли, объединяли и центрифугировали для осаждения клеток. После удаления среды клетки ресуспендировали в среде X-Vivo-15 до концентрации  $400 \times 10^3$  клеток/мл, и дендритные клетки добавляли в каждую клетку 96-луночного планшета (20 тыс. клеток в 50 мкл). Т-клетки человека (Astarte) быстро оттаивали и промывали в среде X-Vivo-15. Клетки ресуспендировали до концентрации  $2 \times 10^6$  клеток/мл, и в каждую лунку добавляли по 100 мкл (200 тыс. клеток/100 мкл). Антитела разбавляли и добавляли в каждую лунку в общем объеме 50 мкл. Смесь инкубировали в течение трех дней при 37 градусах. В это время клетки центрифугировали и 175 мкл применяли для измерения выработки IL2 в качестве меры пролиферации Т-клеток с применением набора V-Plex IL-2 (MSD) в соответствии с рекомендациями производителей.

ТАБЛИЦА 20

| ИД антитела | IC50 в MLR (нМ) | IC50 в MLR (нМ) |
|-------------|-----------------|-----------------|
| A-1 (20A2)  | 0,73            | 0,80            |
| A-3 (20C1)  | 0,97            | 1,65            |
| A-2 (22D4)  | 0,65            | 0,58            |

#### ПРИМЕР 13

При возможности последовательности варибельного домена антитела к PD-1 A-1 (20A2), A-3 (20C1) и A-2 (22D4) конструировали с обеспечением удаления мотивов,

характеризующихся риском деградации боковой цепи. Такие аминокислотные мотивы включают: (1) последовательности CDR "NG" и "NT", проявляющие тенденцию к дезамидированию аспарагина, (2) последовательности CDR "DG", "DH", "DS" и "DT", проявляющие тенденцию к изомеризации аспарагиновой кислоты, (3) и остатки триптофана CDR3, проявляющие тенденцию к окислению. Как правило, элементы для идентичного замещения получали из последовательностей зародышевой линии или из связывающих PD-1 mAb с родственными последовательностями. Для случаев, в которых биоинформатика или структурный анализ не позволяют точно установить элементы для идентичного замещения, выбирали типы остатков, химически сходные с исходным остатком.

Также удаляли мотивы последовательности вариабельного домена, нарушающие тренды ковариации пар остатков при выравнивании нескольких последовательностей. Устранение элементов, нарушающих ковариацию пар остатков, путем замены типами остатков зародышевой линии или родственных зародышевой линии может привести к обеспечению лучшей технологичности благодаря повышению уровней экспрессии mAb и биофизической стабильности. См., Kannan, G. *Method of Correlated Mutational Analysis to Improve Therapeutic Antibodies*. Заявка на патент США PCT/US2012/028596, поданная 9 марта 2012 года. Элементы для идентичного замещения элементов, нарушающих ковариацию, выбирали с применением подхода, сходного с таковым, применяемым для устранения сайтов деградации, как обсуждалось выше.

Конструирование 20A2 дало в результате 20A2.003. Конструирование 20C1 дало в результате 20C1.006 и 20C1.009. Конструирование 22D4 дало в результате 22D4.006 и 22D4.017.

#### ПРИМЕР 14

Активность *in vivo* слитого белка, содержащего антитело к PD-1 22D4.017, слитое с мономером двойного мутеина IL-21, содержащего мутации R9E и R76A ("[22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер)"), оценивали у не подвергавшихся воздействию яванских макаков, представляющих собой субъекты, отличные от человека. Первая группа обезьян получала антитело к PD-1 22D4.017 отдельно (не слитое с мутеином IL-21), а вторая группа обезьян получала слитый белок [22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер). Параметры фармакодинамики (PD) отслеживали с применением FACS в отношении периферической крови, и они включали динамические характеристики иммунных клеток и фосфорилирование фактора транскрипции STAT3 (pSTAT3) в лимфоцитах. Цитокины и перфорины сыворотки крови также изучали с помощью мультиплексного анализа для определения профиля нескольких аналитов (MAP) Millipore Milliplex®. До введения доз проводили анализ параметров периферической крови для обеспечения возможности нормализации наборов данных по исходному уровню. Введение доз начали в день 1. Кровь и сыворотку крови отбирали в заранее определенные фиксированные моменты времени.

Несмотря на активацию Ki67 [фигуры 25A и 25B] и STAT3 [фигуры 25C и 25D] в Т-клетках, существенного увеличения общей популяции Т-клеток не наблюдалось ни в группах, которым вводили антитело 22D4.017, ни в группах, которым вводили слитый

белок [22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер) **[фигуры 25A и 25B]**, что позволяет предположить, что оба эти вида лечения сами по себе были недостаточными для индукции размножения общей популяции Т-клеток **[фигуры 25E и 25F]**. Эти данные подтверждают точку зрения, согласно которой системная блокада передачи сигнала с помощью PD-1 может оказывать более глобальное воздействие на общую популяцию Т-клеток, в том числе на активацию передачи сигнала с помощью STAT3 и Ki67, но согласно которой эти изменения сами по себе могут быть недостаточными для проявления существенного функционального эффекта (что также подтверждается неспособностью монотерапии с помощью антитела к PD-1 или видов лечения с помощью слитого белка индуцировать более генерализованное размножение Т-клеток).

Чтобы лучше понять, как изменения в проксимальной передаче сигнала могут специфически воздействовать на экспрессирующие PD-1 Т-клетки, и поскольку PD-1(+) Т-клетки отражают только небольшую часть общей популяции Т-клеток в периферической крови, эти клетки исследованы более непосредственно путем гейтирования по PD-1(+) CD4 и CD8 Т-клеткам с применением неконкурентного детекторного mAb к PD-1 **[фигуры 16 и 17]**. После начального умеренного снижения абсолютных количеств циркулирующих PD-1(+) клеток эта популяция оставалась стабильной в группе введения антитела [22D4.017]. Напротив, после начального снижения количеств PD-1(+) CD4 и CD8 Т-клеток в периферической крови наблюдали существенное восстановление (выше исходного уровня) количества PD-1(+) клеток через 336 ч. после введения доз в популяции группы обработки с помощью слитого белка [22D4.017]-[R9E: R76A] (мономер) **[фигура 25G]**. Таким образом, несмотря на отсутствие существенного уровня размножения общей популяции, эти данные свидетельствуют о том, что количества PD-1(+) Т-клеток увеличиваются избирательно при введении слитого белка [22D4.017]-[R9E: R76A] (мономер) **[фигура]**.

Чтобы определить возможное функциональное воздействие размножения PD-1(+) Т-клеток, исследовали взаимосвязь между размножением PD-1(+) CD4/8 Т-клеток и уровнем перфорины в сыворотке крови. Действительно, данные свидетельствуют о том, что между этими двумя параметрами существует положительная взаимосвязь: уровень перфорины в сыворотке крови является наиболее высоким у животных, которым вводили слитый белок [22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер), у которых наблюдали существенное увеличение уровня PD-1(+) Т-клеток в периферической крови **[фигура 25I]**.

Взятые вместе, эти данные свидетельствуют о том, что хотя системное воздействие слитого белка [22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер) не обеспечивало увеличения количества всей общей популяции Т-клеток, блокады PD-1 и одновременной доставки сигнала IL-21 в одной и той же клетке (экспрессирующей PD-1) достаточно для индукции размножения популяции. Это также коррелирует с увеличением уровня перфорины в сыворотке крови **[фигура 25I]**.

#### ПРИМЕР 15

В следующем примере продемонстрированы значения аффинности связывания различных антител к PD-1.

Значения аффинности связывания антитела к PD-1::PD-1, полученные с помощью Octet, характеризовали следующим образом. Для количественной оценки аффинности связывания в виде  $K_D$  (константы равновесной диссоциации) между антителами к PD-1 и рекомбинантным растворимым PD-1 человека или яванского макака, измеряли константы скорости ассоциации и диссоциации с применением либо прибора Octet® RED384 от Pall® ForteBio® в режиме 16 наконечников, либо прибора Octet® HTX от Pall® в режиме 96 наконечников. Во всех случаях наконечники аминореактивного волоконно-оптического биосенсора второго поколения (AR2G) применяли для ковалентного захвата антител до конечных уровней нагрузки от 2,5 до 4 нм. В способе анализа связывания применяли следующие стадии иммобилизации: (1) уравнивание в воде, 60 секунд; (2) активацию с помощью свежего 20 mM 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимида гидрохлорида (EDC) в смеси с 10 mM N-гидроксисульфосукцинимидом (сульфо-NHS), 600 секунд; (3) иммобилизацию 20 нМ антител, разведенных в 10 mM ацетатном буфере с pH 6,0, 2000 секунд; (4) гашение с помощью 1 M этаноламина, 300 секунд; и наконец (5) инкубирование на исходном уровне в подвижном буфере Octet (10 mM TRIS, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,13% (об./об.) Triton X-100 и 0,10 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA)), 60 секунд. Согласно рекомендациям производителя, все эксперименты проводили с помощью 384-луночных черных планшетов для образцов (объем на лунку 100 мкл) при 27°C и 1000 об./мин.

В случае каждого взаимодействия Ab::PD-1 для столбца из восьми наконечников иммобилизацию осуществляли одинаково, как описано выше, с помощью того же антитела. Три наконечника применяли для связывания растворимого PD-1 (1-170)-FLAG-His человека в серии из трех точек разведений, еще три наконечника применяли для связывания растворимого PD-1(1-167)-FLAG-His яванского макака в серии из трех точек разведений, а затем остальные два наконечника (с иммобилизованным Ab, как и остальные наконечники в столбце) подвергали воздействию буфера Octet® с получением эталонных наконечников. Все волоконно-оптические наконечники применяли один раз, а затем утилизировали; т. е. восстановление не осуществляли. Кривые связывания PD-1 человека и яванского макака получали посредством создания серий последовательных разведений 1:3 растворимого рецептора PD-1 в подвижном буфере Octet; конечные концентрации PD-1 составляли 30, 10 и 3,3 нМ (за исключением таковых для антитела mAb к PD-1, представляющего собой IgG4, для которого концентрация PD-1 составляла 33, 11, 3,7 нМ). Волоконно-оптические биосенсоры с иммобилизованными антителами инкубировали в лунках, содержащих серию последовательных разведений PD-1, в течение 300 секунд (стадия ассоциации), а затем перемещали в лунки только с подвижным буфером на 500 секунд (стадия диссоциации).

Исходные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения для анализа показаний прибора (v10). Для каждого столбца сенсорных датчиков сигнал связывания двух эталонных сенсорных датчиков усредняли и вычитали его из сигналов остальных шести сенсорных датчиков с образцами. Затем данные, полученные в результате вычитания сигнала эталона, обрабатывали с применением параметров программного обеспечения по

умолчанию: ось Y выровнена по исходному уровню, межстадийная коррекция по диссоциации и окончательная обработка с помощью фильтра Савицкого-Голая. Окончательно обработанные данные по связыванию каждого антитела либо с тремя концентрациями PD-1 человека, либо с тремя концентрациями PD-1 яванского макака затем в целом аппроксимировали по модели связывания 1:1 и изображали в виде графика. На всех графиках показаны как обработанные данные, так и аппроксимация по модели связывания 1:1. Аппроксимацию по модели связывания 1:1 применяли для определения константы скорости ассоциации ( $k_a$ ; единицы измерения -  $M^{-1}сек^{-1}$ ) и константы скорости диссоциации ( $k_d$ ; единицы измерения -  $сек^{-1}$ ). Равновесную константу диссоциации ( $K_D$ ; единицы измерения - наномоль ( $nM$ ) =  $1 \times 10^{-9}$  моль/л) затем рассчитывали в виде отношения  $k_d/k_a$ .

На фигуре 26 показаны профили связывания антител к PD-1, 22D4.017, 20C1.009 и 20A2.003, протестированных параллельно с двумя антителами mAb к PD-1 (антителом mAb к PD-1, представляющим собой IgG1, и антителом mAb к PD-1, представляющим собой IgG4). Профили связывания определяли с применением системы Octet® от FortéBio. Связывание показано по рецепторам PD-1 человека и яванского макака.

Как показано на фигурах 26А-26Е, антитела 22D4.017, 20C1.009 и 20A2.003 PD-1 демонстрировали значения  $K_D$ , которые были в 2-14 раз выше, чем таковые коммерчески доступных антител при их тестировании в отношении белка PD-1 человека. Кроме того, анализ перекрестной реактивности белка PD-1 яванского макака с антителами 22D4.017, 20C1.009 и 20A2.003 показал в общем сходную аффинность, тогда как для коммерчески доступных антител показали примерно 2-кратную разницу в аффинности (фигура 26F-26J).

#### ПРИМЕР 16

В следующем примере продемонстрирована стабильность различных антител к PD-1.

Термическую конформационную стабильность антител к PD-1 характеризовали следующим образом. Антитела 20C1.009 и 22D4.017 оценивали в отношении термостабильности с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). DSC представляет собой методику, с помощью которой значения теплоемкости измеряют в виде функции от температуры. Сигнал от клетки образца сравнивают с таковым от эталонной клетки, в которой отсутствует белок. При повышении температуры клеток измеряют энтальпию и температуру плавления, ширину пика для каждого конформационного перехода с разворачиванием. Это дает информацию о термостабильности и структуре белка более высокого порядка, в том числе о термостабильности белковых доменов. На фигуре 27 представлена термограмма DSC каждого антитела к PD-1 при концентрации 1 мг/мл в A52SuT, а в таблице 21 представлена  $T_m$  для каждого тестируемого антитела.

ТАБЛИЦА 21

| Антитело                                      | 20C1,009 | 22D4,017 |
|-----------------------------------------------|----------|----------|
| <b><math>T_m</math>, полученная с помощью</b> | 75,1 °C  | 66,1 °C  |

|            |  |  |
|------------|--|--|
| <b>DSC</b> |  |  |
|------------|--|--|

Вязкость дополнительно определяли с применением системы конус-плита (TA Instruments, Нью-Касл, Делавер) путем измерения сопротивления потоку, обусловленного силами трения между молекулами. Процедуру измерения напряжения сдвига при изменяющейся скорости сдвига применяли в диапазоне от 100 до 1000 с<sup>-1</sup> с применением системы конус-плита 20 мм 1,988° и стальной плиты с элементами Пельтье - 990918. Вязкость измеряли в Па•с, где 1 мПа•с=1 сП при 1000 с<sup>-1</sup>. Вязкость измеряли для каждого антитела при 70 и 150 мг/мл, при этом в буфер для составления (A52Su) добавляли 0,01% поверхностно-активного вещества. Все образцы подвергали измерениям при комнатной температуре. Данные по вязкости (скорость сдвига 1000) показаны на фигуре 28 и представлены в таблице 22.

ТАБЛИЦА 22

| <b>Антитело</b> | <b>сП для концентрации 70<br/>мг/мл</b> | <b>сП для концентрации 150<br/>мг/мл</b> |
|-----------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>22D4.017</b> | 3,4                                     | 44,7                                     |
| <b>20C1.009</b> | 2,5                                     | 7,1                                      |

Свойства стабильности антитела являются важными факторами, учитываемыми при разработке кандидатов терапевтических средств. Например, проявление антителом тенденции к агрегации (образованию крупных комплексов в растворе, которое может привести к осаждению) может влиять на срок хранения, способ введения (например, i.v. в сравнении с подкожным) и активность молекулы. Как правило, свойства термостабильности и вязкости антитела являются хорошими показателями способности антитела сохранять структурную целостность при высоких температурах и высоких концентрациях. Как демонстрируют данные, приведенные выше, 20C1.009 проявляет свойства стабильности, которые делают его особенно подходящим в качестве терапевтического средства, которое пригодно как для i.v., так и для подкожного (и в высокой концентрации) введения.

#### ПРИМЕР 17

В данном примере продемонстрирована активность IL-21, вызванная различными слитыми белками.

Различные слитые белки, содержащие мутеин IL-21, получали и тестировали в отношении активности IL-21 с применением анализа pSTAT3 AlphaLISA®. Один содержал моноклональное антитело (mAb) к TIGIT, а второй содержал mAb к LAG3. Для применения в этих экспериментах получали четыре линии клеток: (A) вариантную линию Т-клеток Hut78, которая является положительной по PD-1, (B) вариантную линию Т-клеток Hut78, которая является положительной по TIGIT, (C) вариантную линию Т-клеток Hut78, которая является положительной по LAG3, и (D) родительскую линию Т-клеток Hut78, которая не экспрессирует эндогенно PD-1, TIGIT или LAG3. Все четыре линии клеток подвергали



воздействию (i) отдельно rhIL-21, (ii) отдельно антитела mAb к PD-1, (iii) отдельно антитела mAb к TIGIT, (iv) отдельно антитела mAb к LAG3, (v) антитела mAb к PD-1, слитого с мутеином IL-21 (R5Q:R76E) (мономером), (vi) антитела mAb к TIGIT, слитого с мутеином IL-21 (R5Q:R76E) (димером), и (vii) антитела mAb к LAG3, слитого с мутеином IL-21 (R5Q:R76E) (димером).

Результаты анализа фосфорилирования STAT3 и значения EC50 каждой молекулы в отношении передачи сигнала с помощью STAT показаны на фигурах 29A-29D и в таблице 23 соответственно.

ТАБЛИЦА 23

| <u>Молекула</u>                                   | <u>Родительская</u><br><u>Hut78</u> | <u>Hut78/PD-1</u> | <u>Hut78/TIGIT</u> | <u>Hut78/Lag3</u> |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
|                                                   | <u>EC50 (nM)</u>                    | <u>EC50 (nM)</u>  | <u>EC50 (nM)</u>   | <u>EC50 (nM)</u>  |
| rhIL-21                                           | 65                                  | 59                | 58                 | 68                |
| Антитело mAb к PD-1                               | -                                   | -                 | -                  | -                 |
| Антитело mAb к TIGIT                              | -                                   | -                 | -                  | -                 |
| Антитело mAb к LAG3                               | -                                   | -                 | -                  | -                 |
| Продукт слияния антитела mAb к PD-1+мутеина IL-21 | -                                   | 341               | -                  | -                 |
| Продукт слияния mAb к TIGIT+мутеин IL-21          | -                                   | -                 | 1390               | -                 |
| Продукт слияния mAb к LAG3+мутеин IL-21           | -                                   | -                 | -                  | -                 |

Как показано на фигурах 29A-29D и в таблице 23, слитые белки на основе антитела к TIGIT и антитела к LAG3 проявляют значительно сниженную молярную активность (на основе антитела к TIGIT) или не проявляют поддающейся измерению молярной активности (на основе антитела к LAG3) по сравнению с rhIL-21.

Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в той же мере, как если бы каждый документ был конкретно и отдельно указан как включенный посредством ссылки и был представлен во всей своей полноте в данном документе.

Использование терминов в единственном числе, множественном числе и подобных определений в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте нижеследующей формулы изобретения) должны толковаться как охватывающие как единственное число, так и множественное число, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Термины "состоящий", "имеющий", "включающий" и "содержащий" следует понимать, как открытые термины (т. е.

означающие "включающий без ограничения"), если не указано иное.

Предусматривается, что приведение диапазонов значений в данном документе служит исключительно в качестве способа сокращения индивидуального указания каждого отдельного значения, входящего в данный диапазон, и каждой конечной точки, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение и конечная точка включены в настоящее описание, как если бы они были индивидуально упомянуты в данном документе.

Все способы, описанные в данном документе, можно выполнять в любом удобном порядке, если иное не указано в данном документе, или иное явно не противоречит контексту. Применение любых видов примеров или иллюстративных формулировок (например, "такой как"), предусмотренных в данном документе, предназначено исключительно для лучшего освещения настоящего изобретения и не накладывает ограничений на объем настоящего изобретения, если не заявлено иное. Ни одна формулировка в настоящем описании не должна истолковываться как указывающая на какой-либо незаявленный элемент как существенный для практической реализации настоящего изобретения.

В данном документе описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, включая наилучший способ, известный авторам настоящего изобретения, для осуществления настоящего изобретения. Вариации этих предпочтительных вариантов осуществления могут стать очевидными для специалистов в данной области после прочтения вышеуказанного описания. Авторы настоящего изобретения ожидают, что специалисты в данной области будут использовать такие вариации соответствующим образом, и авторы настоящего изобретения предполагают, что настоящее изобретение будет реализовано на практике иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно, настоящее изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, упомянутого в прилагаемой к данному документу формуле изобретения, в установленных применимым законом пределах. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех возможных их вариациях охватывается настоящим изобретением, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Мутеин IL-21, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2,

QGQDX HMXXM XXXXX XVDXL KNXVN DLVPE FLPAP EDVET NCEWS  
AFSCF QKAQL KSANT GNNEX XIXXX XXXLX XXXXX TNAGR RQKHR LTCPS CDSYE  
KKPPK EFLXX FXXLL XXMXX QHXSS RTHGS EDS (SEQ ID NO: 2),

где "X" представляет собой любую аминокислоту, и

где указанная аминокислотная последовательность мутеина IL-21 отличается от аминокислотной последовательности IL-21 человека (SEQ ID NO: 1) по меньшей мере 1 аминокислотой.

2. Мутеин IL-21 по п. 1, содержащий аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности IL-21 человека (SEQ ID NO: 1) не более чем 7 аминокислотами.

3. Мутеин IL-21 по п. 2, содержащий аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности IL-21 человека (SEQ ID NO: 1) 3, 4, 5 или 6 аминокислотами.

4. Мутеин IL-21 по п. 3, содержащий аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности IL-21 человека (SEQ ID NO: 1) 1 или 2 аминокислотами.

5. Мутеин IL-21 по любому из пп. 1-4, где отличие(отличия) между аминокислотной последовательностью мутеина IL-21 и аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1 имеет(имеют) место в пределах аминокислот 10-15 включительно или аминокислот 105-123 включительно в SEQ ID NO: 2, где отличие(отличия) необязательно имеет(имеют) место по аминокислотам 11, 14, 15, 109, 110, 112, 113, 116, 119, 120, и/или 123 в SEQ ID NO: 2.

6. Мутеин IL-21 по любому из пп. 1-4, где отличие(отличия) между аминокислотной последовательностью мутеина IL-21 и аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1 имеет(имеют) место в пределах аминокислот 5-25 включительно или аминокислот 65-80 включительно в SEQ ID NO: 2, где отличие(отличия) необязательно имеет(имеют) место по аминокислотам 5, 8, 9, 12, 13, 16, 19, 23, 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79 и/или 80 в SEQ ID NO: 2.

7. Мутеин IL-21 по любому из пп. 4-6, содержащий аминокислотную последовательность с одной аминокислотной заменой по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 человека (SEQ ID NO: 1).

8. Мутеин IL-21 по п. 7, где аминокислотная замена имеет место в положении 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 109, 110, 112, 113, 116, 117, 119, 120, или 123 в SEQ ID NO: 1.

9. Мутеин IL-21 по п. 8, где аминокислотная замена имеет место в положении 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 65, 66, 68, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 109, 110, 112, 113, 116, 117, 119, 120, или 123 в SEQ ID NO: 1.

10. Мутеин IL-21 по п. 9, содержащий аминокислотную замену:

а. в положении 5, 8, 9, 12, 14, 15, 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 80, 116, или 119 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является алифатической аминокислотой;

б. в положении 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 110, 112, 116, 117, 119, 120, или 123 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является кислой аминокислотой;

с. в положении 5, 9, 73, 76, 109, 113 или 116 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является основной аминокислотой;

д. в положении 5, 8, 9, 70 или 76 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является ароматической аминокислотой;

е. в положении 5, 8, 9, 12, 15, 73, 76, 116 или 119 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является аминокислотой, содержащей амидную группу в боковой цепи;

ф. в положении 5, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 73, 76, 116 или 119 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является неароматической аминокислотой, содержащей гидроксильную группу в боковой цепи;

г. в положении 65, 66, 69, 70, 72, 73, 75, 76, 77 или 80 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является иминокислотой;

h. в положении 5, 9, 15, 76, 116 или 119 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является аминокислотой, содержащей серосодержащую боковую цепь; или

i. или в их комбинации.

11. Мутеин IL-21 по п. 10, где заменяющая аминокислота является встречающейся в природе аминокислотой.

12. Мутеин IL-21 по п. 7, содержащий аминокислотную замену аминокислотой в положении в соответствии с таблицей А:

ТАБЛИЦА А

| Аминокислотное положение в SEQ ID NO: 1 | Аминокислота (в виде однобуквенного кода)       | Аминокислотное положение в SEQ ID NO: 1 | Аминокислота (в виде однобуквенного кода) |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------|
| 5                                       | A, D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, или Y | 72                                      | D, G, или P                               |
| 8                                       | A, D, E, N, S, T, V, или Y                      | 73                                      | A, D, E, G, H, I, N, P, Q, S, или V       |
| 9                                       | A, D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, S, T, V, или Y | 75                                      | D, G, или P                               |
| 11                                      | D или S                                         | 76                                      | A, D, E, G, H, I, K, L,                   |

|    |                                  |     |                                        |
|----|----------------------------------|-----|----------------------------------------|
|    |                                  |     | M, N, P, Q, S, T, V,<br>или Y          |
| 12 | A, D, E, N, S, T, или<br>V       | 77  | D, G, или P                            |
| 13 | D                                | 78  | D                                      |
| 14 | A, D, или S                      | 79  | D                                      |
| 15 | A, E, I, M, N, Q, S, T,<br>или V | 80  | G, или P                               |
| 16 | D или E                          | 109 | K                                      |
| 19 | D                                | 110 | D                                      |
| 23 | D                                | 112 | D                                      |
| 65 | D, G, или P                      | 113 | K                                      |
| 66 | D, G, или P                      | 116 | A, D, E, I, K, L, M, N,<br>S, T, или V |
| 68 | Q                                | 117 | D                                      |
| 69 | D, G, или P                      | 119 | A, D, E, M, N, Q, S,<br>или T          |
| 70 | E, G, P, или Y                   | 120 | D                                      |
| 71 | L                                | 123 | D                                      |

13. Мутеин IL-21, содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 3-21, 23-56, 58-112, 114-198, 249-254, и 283.

14. Мутеин IL-21 по любому из пп. 4-6, содержащий аминокислотную последовательность с двумя аминокислотными заменами по сравнению с аминокислотной последовательностью IL-21 человека (SEQ ID NO: 1).

15. Мутеин IL-21 по п. 14, где аминокислотная замена имеет место в двух из положений 5, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 23, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 109, 110, 112, 113, 116, 117, 119, 120, или 123 в SEQ ID NO: 1.

16. Мутеин IL-21 по п. 15, где аминокислотные замены имеют место в двух из положений 5, 9, 15, 70, 71, 72, 73, и 76 в SEQ ID NO: 1.

17. Мутеин IL-21 по п. 16, где аминокислотные замены имеют место в двух из положений 5, 9, 73 и 76 в SEQ ID NO: 1.

18. Мутеин IL-21 по п. 17, где одна из замен имеет место в положении 76 в SEQ ID NO: 1.

19. Мутеин IL-21 по п. 18, где заменяющая аминокислота в положении 76 в SEQ ID NO: 1 является алифатической аминокислотой или кислой аминокислотой.

20. Мутеин IL-21 по любому из пп. 15-19, содержащий аминокислотную замену в положении 5, 9 или 73 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является

алифатической аминокислотой или кислой аминокислотой.

21. Мутеин IL-21 по любому из пп. 15-19, содержащий аминокислотную замену в положении 5 в SEQ ID NO: 1, где заменяющая аминокислота является аминокислотой с амидной группой в боковой цепи.

22. Мутеин IL-21 по п. 19 или п. 20, где алифатическая аминокислота представляет собой аланин.

23. Мутеин IL-21 по п. 19 или п. 20, где кислая аминокислота представляет собой глутаминовую кислоту.

24. Мутеин IL-21 по п. 21, где аминокислота с амидной группой в боковой цепи представляет собой глутамин.

25. Мутеин IL-21, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 199-208, 210-222, 224-248 и 255.

26. Мутеин IL-21 по любому из предыдущих пунктов, где мутеин IL-21 связывается с рецептором IL-21 со сниженной аффинностью по сравнению с аффинностью IL-21 дикого типа к рецептору IL-21.

27. Мутеин IL-21 по любому из предыдущих пунктов, который связывается с рецептором IL-21, имеющим аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 256.

28. Мутеин IL-21 по любому из предыдущих пунктов, который связывается с гамма-цепью рецептора IL-21, имеющей аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 257.

29. Мутеин IL-21 по любому из предыдущих пунктов, который связывается с рецептором IL-21 человека с  $K_d$ , которая превышает или равняется приблизительно 0,04 нМ.

30. Конъюгат, содержащий:  
мутеин IL-21 по любому из предыдущих пунктов и  
гетерологичный фрагмент.

31. Конъюгат по п. 30, где мутеин IL-21 непосредственно присоединен к гетерологичному фрагменту.

32. Конъюгат по п. 30, где мутеин IL-21 присоединен к гетерологичному фрагменту посредством линкера.

33. Конъюгат по п. 32, где линкер включает в себя пептид.

34. Конъюгат по п. 33, где пептид содержит аминокислотную последовательность Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 262).

35. Конъюгат по любому из пп. 30-34, где гетерологичный фрагмент представляет собой полипептид.

36. Конъюгат по п. 35, где полипептид представляет собой антигенсвязывающий белок.

37. Конъюгат по п. 36, где антигенсвязывающий белок представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент антитела.

38. Конъюгат по п. 37, где антитело представляет собой антитело к PD-1.

39. Конъюгат по любому из пп. 30-38, где антитело к PD-1 содержит константную область, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 265-267, 282, 284-311.

40. Конъюгат по пп. 30-39, где мутеин IL-21 непосредственно присоединен к Fc антитела.

41. Конъюгат по п. 40, где мутеин IL-21 присоединен к Fc антитела посредством линкера.

42. Конъюгат по п. 40 или п. 41, где указанный конъюгат содержит один мутеин IL-21, при этом указанный один мутеин IL-21 связан с С-концом одной из двух тяжелых цепей антитела.

43. Конъюгат по п. 40 или п. 41, где указанный конъюгат содержит два мутеина IL-21, где первый мутеин IL-21 связан с С-концом первой тяжелой цепи антитела, и второй мутеин IL-21 связан с С-концом второй тяжелой цепи антитела.

44. Конъюгат по п. 43, где указанный первый мутеин IL-21 имеет ту же аминокислотную последовательность, что и второй мутеин IL-21.

45. Конъюгат по п. 43, где указанный первый мутеин IL-21 имеет отличающуюся аминокислотную последовательность по сравнению со вторым мутеином IL-21.

46. Конъюгат по любому из пп. 30-45, где тяжелые цепи антитела содержат мутации с заменой пар заряженных аминокислот.

47. Конъюгат по любому из пп. 30-46, где мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены в двух из положений 5, 9, 73 и 76 в SEQ ID NO: 1.

48. Конъюгат, содержащий:  
мутеин IL-21, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, если не считать того, что указанный мутеин IL-21 содержит аминокислотные замены в любых двух из положений 5, 9, 73 и 76 в SEQ ID NO: 1, и  
антитело к PD-1,  
где мутеин IL-21 связан с С-концом антитела к PD-1.

49. Конъюгат по п. 48, где антитело к PD-1 содержит константную область, содержащую аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 265-267, 282, 284-311.

50. Слитый полипептид или слитый белок, содержащий мутеин IL-21 по любому из предыдущих пунктов и гетерологичный полипептид или пептид.

51. Слитый полипептид или слитый белок по п. 50, содержащий иммуноглобулин или его антигенсвязывающий фрагмент антитела.

52. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую мутеин IL-21 по любому из предыдущих пунктов.

53. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 52.

54. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 52 или вектор по п. 53.

55. Набор, содержащий мутеин IL-21, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку-хозяина, конъюгат, слитый полипептид или слитый белок или их комбинацию по любому из

предыдущих пунктов и контейнер.

56. Фармацевтическая композиция, содержащая мутеин PL-21, нуклеиновую кислоту, вектор, клетку-хозяина, конъюгат, слитый полипептид или слитый белок или их комбинацию по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

57. Способ получения мутеина PL-21, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 54 в целях обеспечения экспрессии мутеина PL-21 и сбор экспрессирующегося мутеина PL-21.

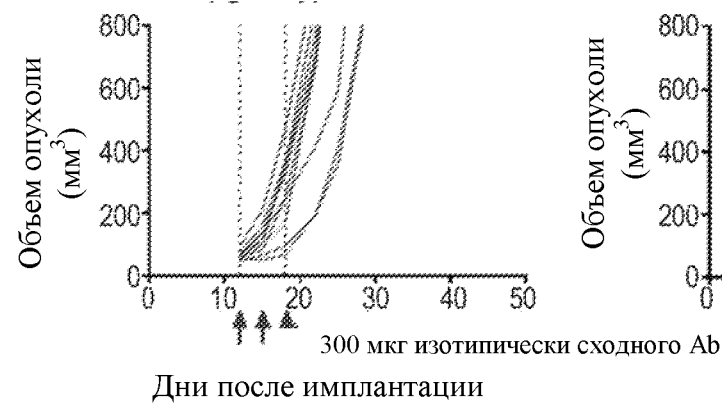
58. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции по п. 56 в количестве, эффективном для лечения субъекта.

59. Способ по п. 58, где субъект имеет солидную опухоль, и фармацевтическую композицию вводят субъекту в количестве, эффективном для лечения солидной опухоли у субъекта.

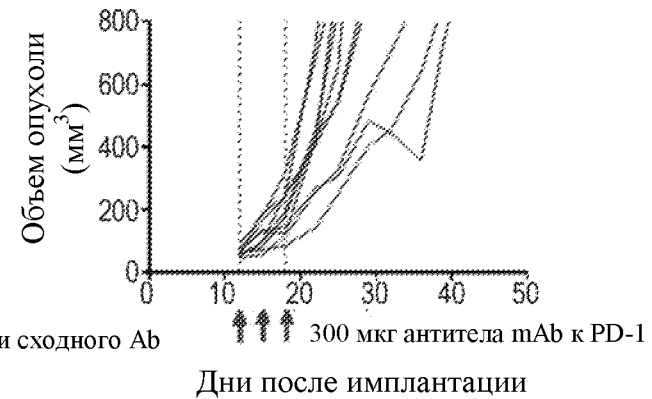
По доверенности



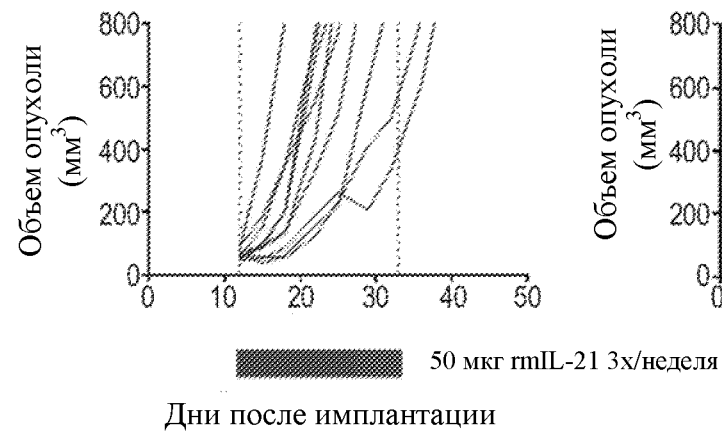
**Фиг. 1А** Группа 1 – 300 мкг  
изотипически сходного Ab



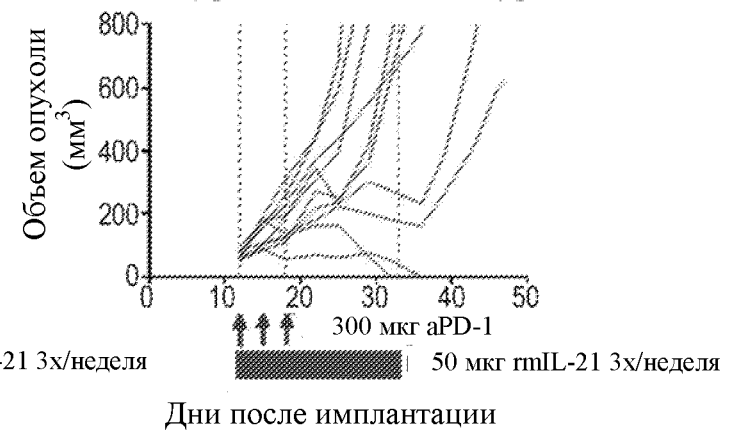
**Фиг. 1В** Группа 2 – 300 мкг  
антитела mAb к PD-1



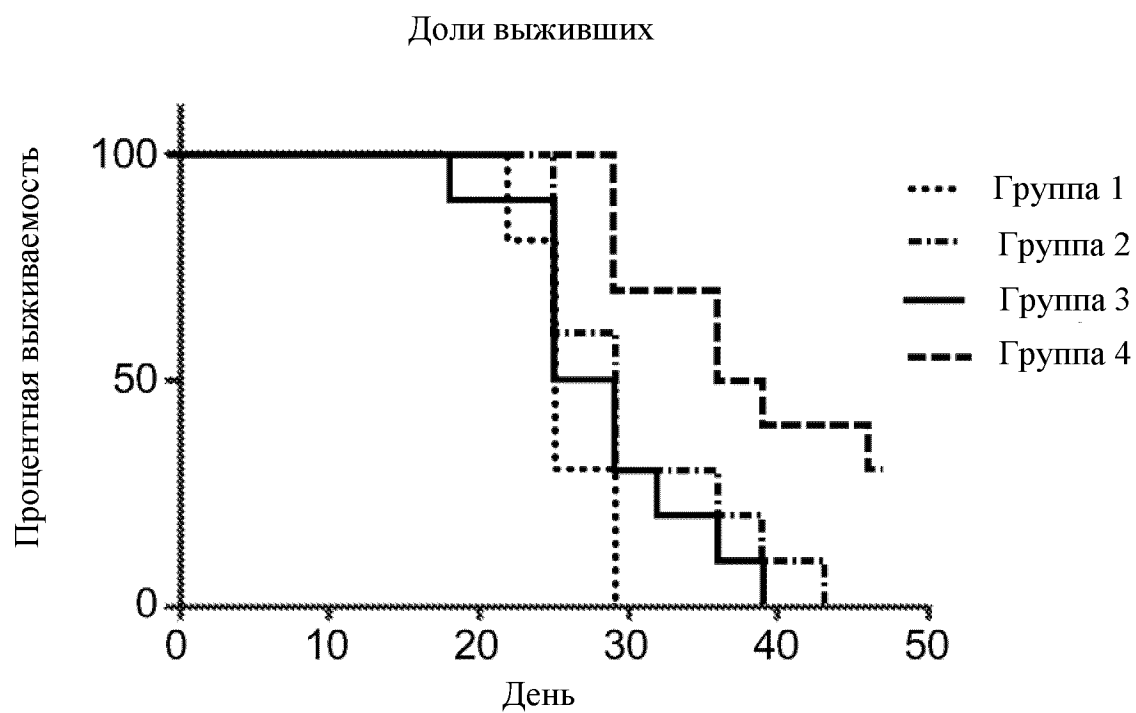
**Фиг. 1С** Группа 3 – 50 мкг IL21



**Фиг. 1D** Группа 4 – 300 мкг антитела mAb к  
PD-1 + 50 мкг IL21

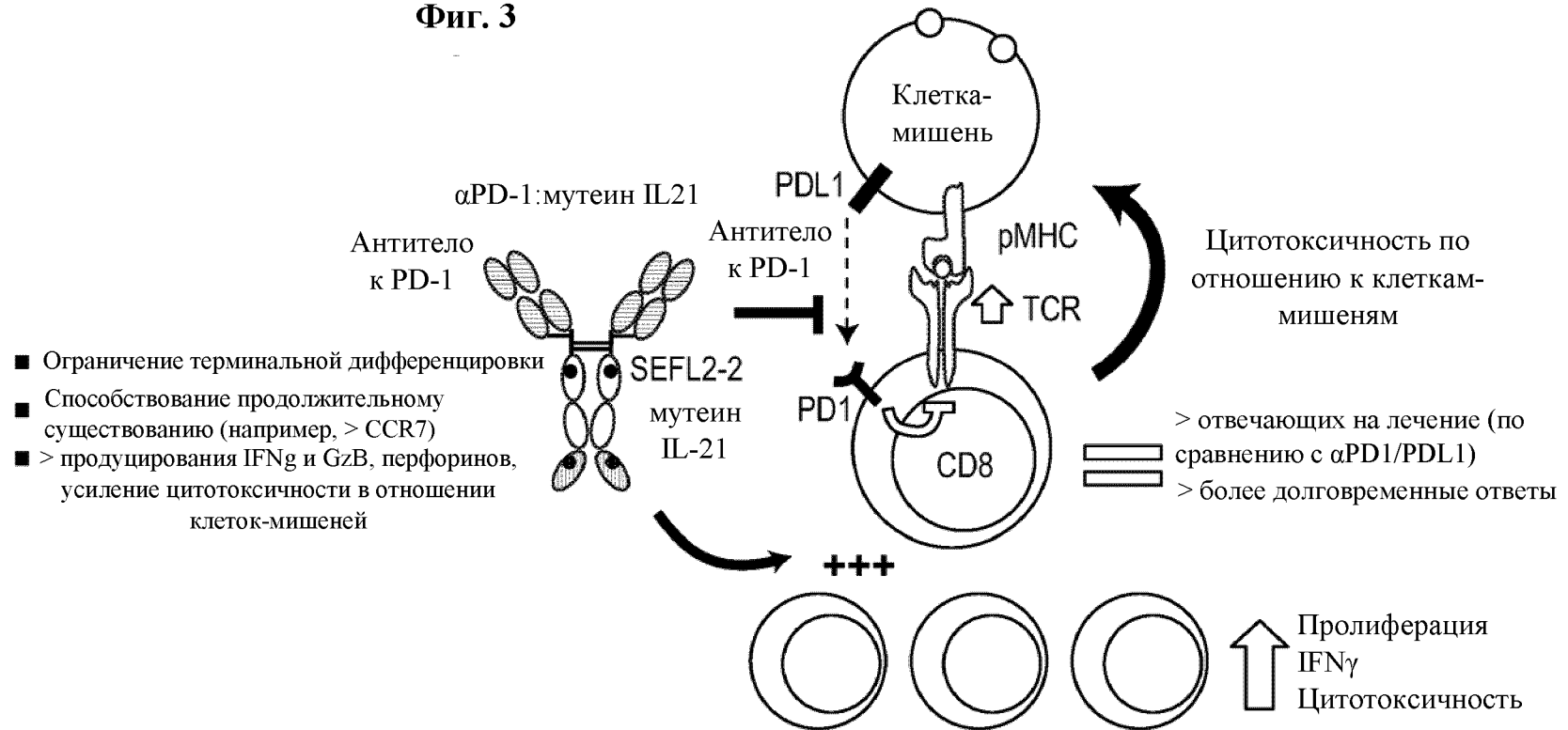


ФИГ. 2

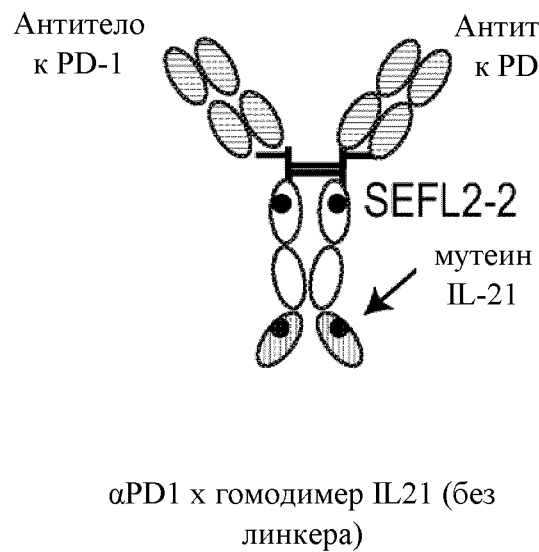


Изотипический контроль в сравнении с IL-21,  $p = ns, 0,1269$   
 Изотипический контроль в сравнении с mAb  $\alpha$ PD-1,  $p = 0,0408$   
 Изотипический контроль в сравнении с комбинацией,  $p = 0,0002$   
 mAb  $\alpha$ PD-1 в сравнении с комбинацией,  $p = 0,0143$   
 IL-21 в сравнении с комбинацией,  $p = 0,0047$

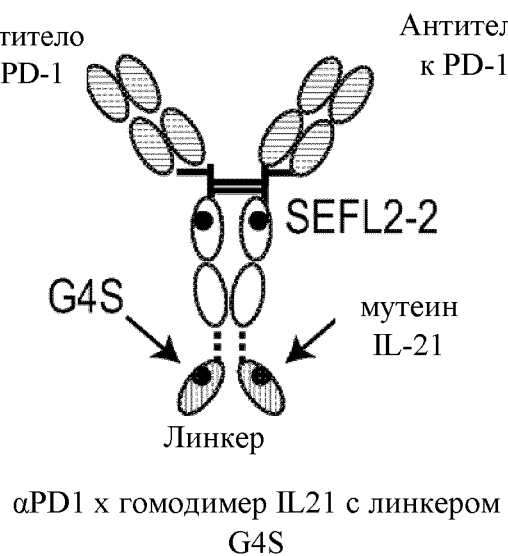
Фиг. 3



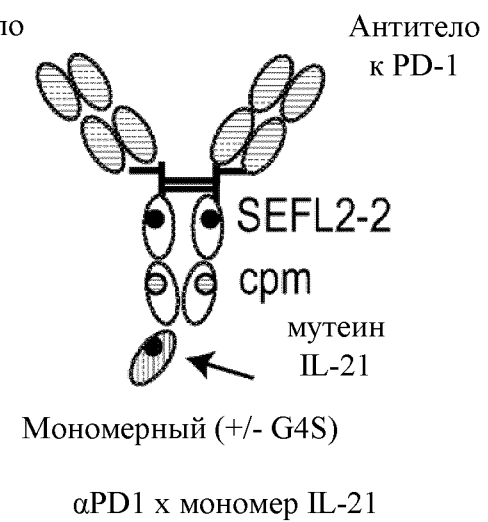
ФИГУРА 4А



ФИГУРА 4В

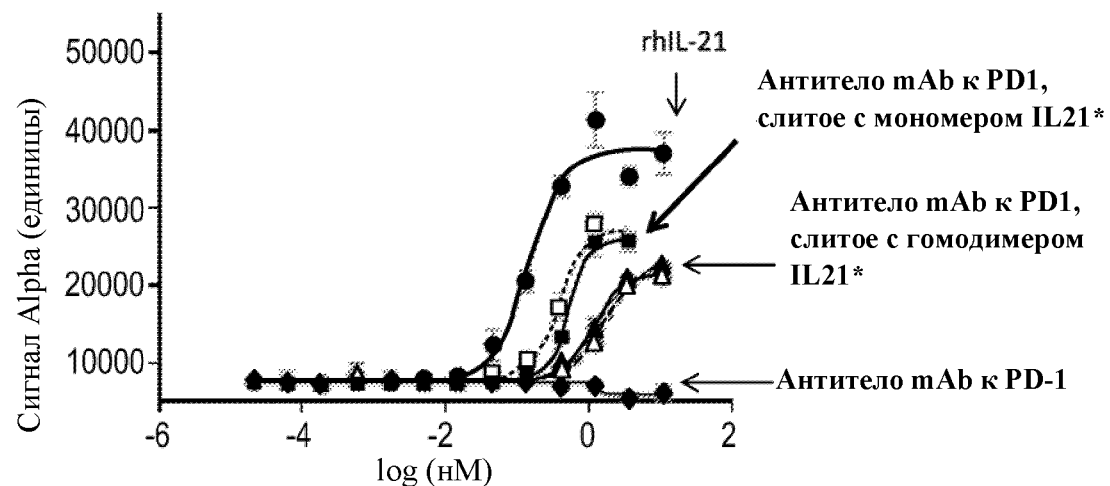


ФИГУРА 4С

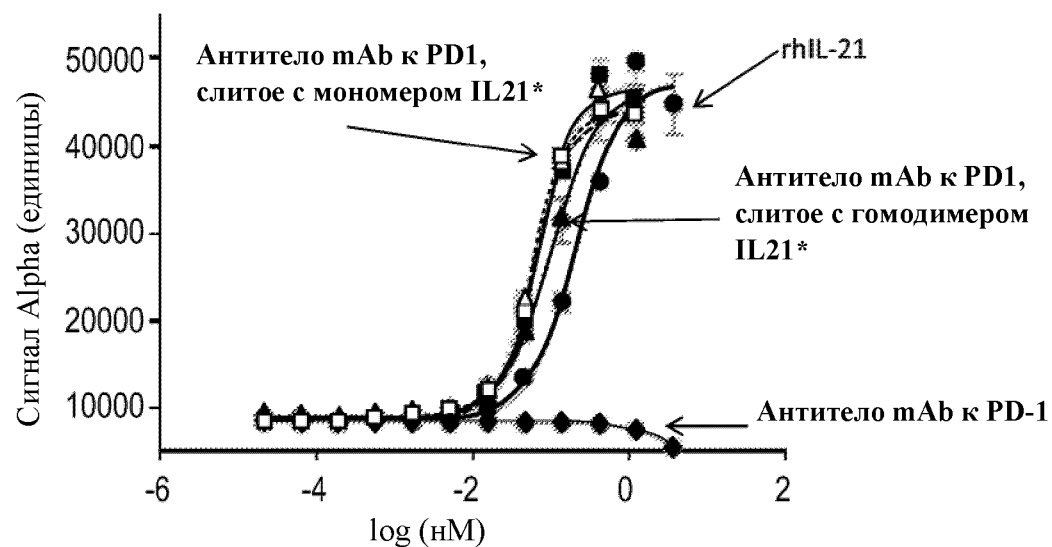


Фиг. 5

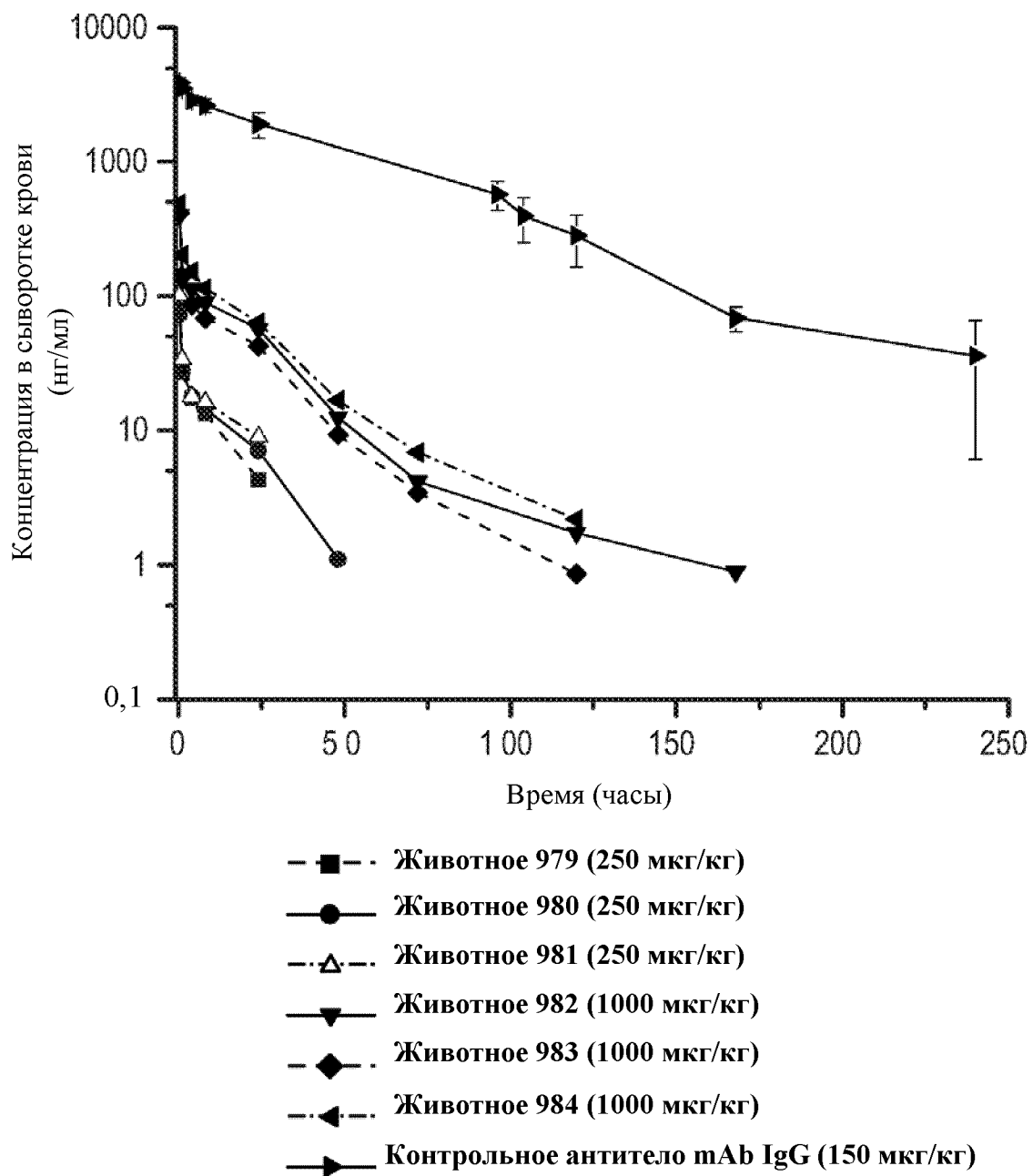
**ФИГУРА 5А: AlphaLISA в отношении pSTAT3 в Т-клетках Nut78: PD-1<sup>-ve</sup>**



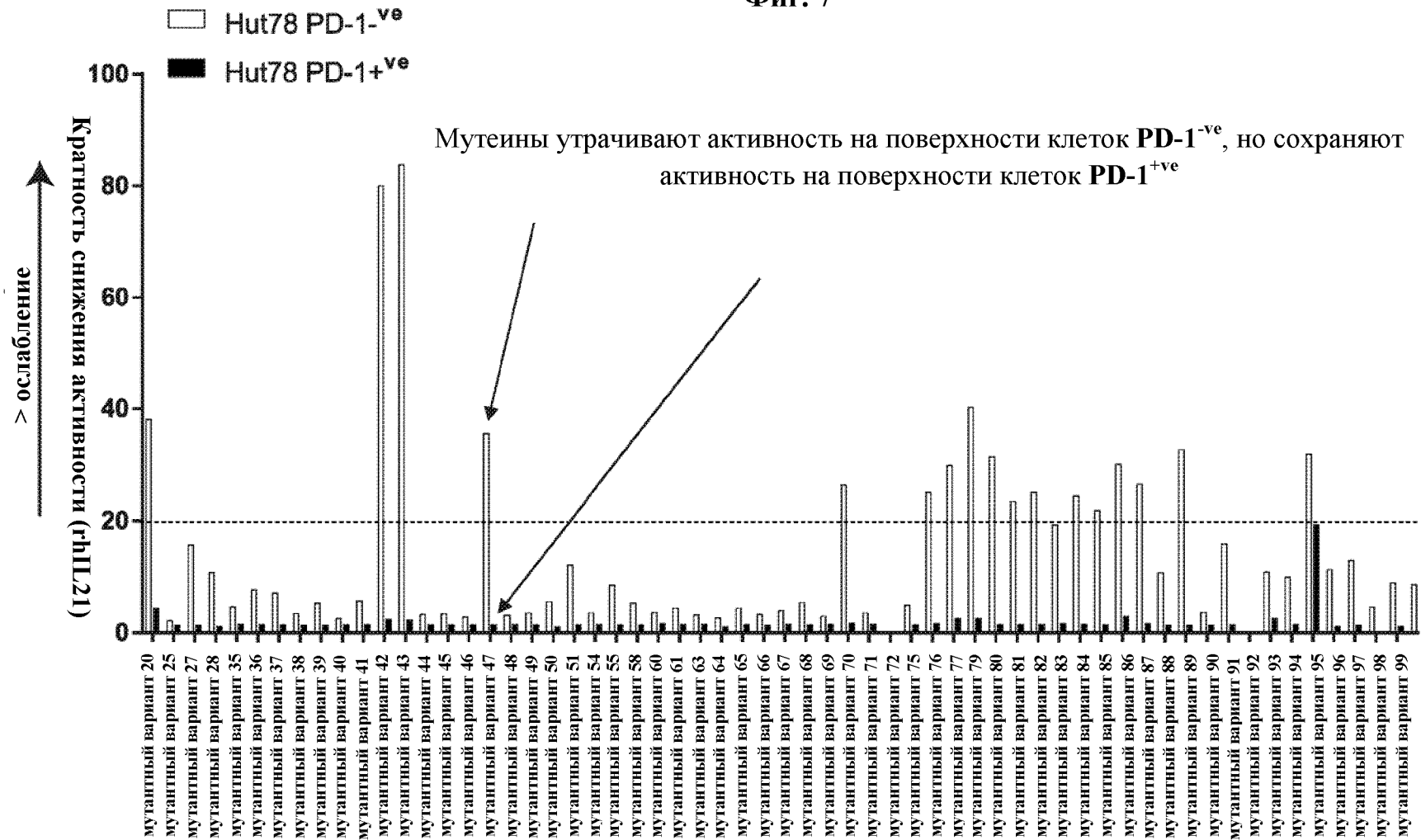
**ФИГУРА 5В: AlphaLISA в отношении pSTAT3 в Т-клетках Nut78: PD-1<sup>+ve</sup>**



\*Сплошной линией представлен продукт слияния без линкера, и точечной пунктирной линией представлен продукт слияния с линкером



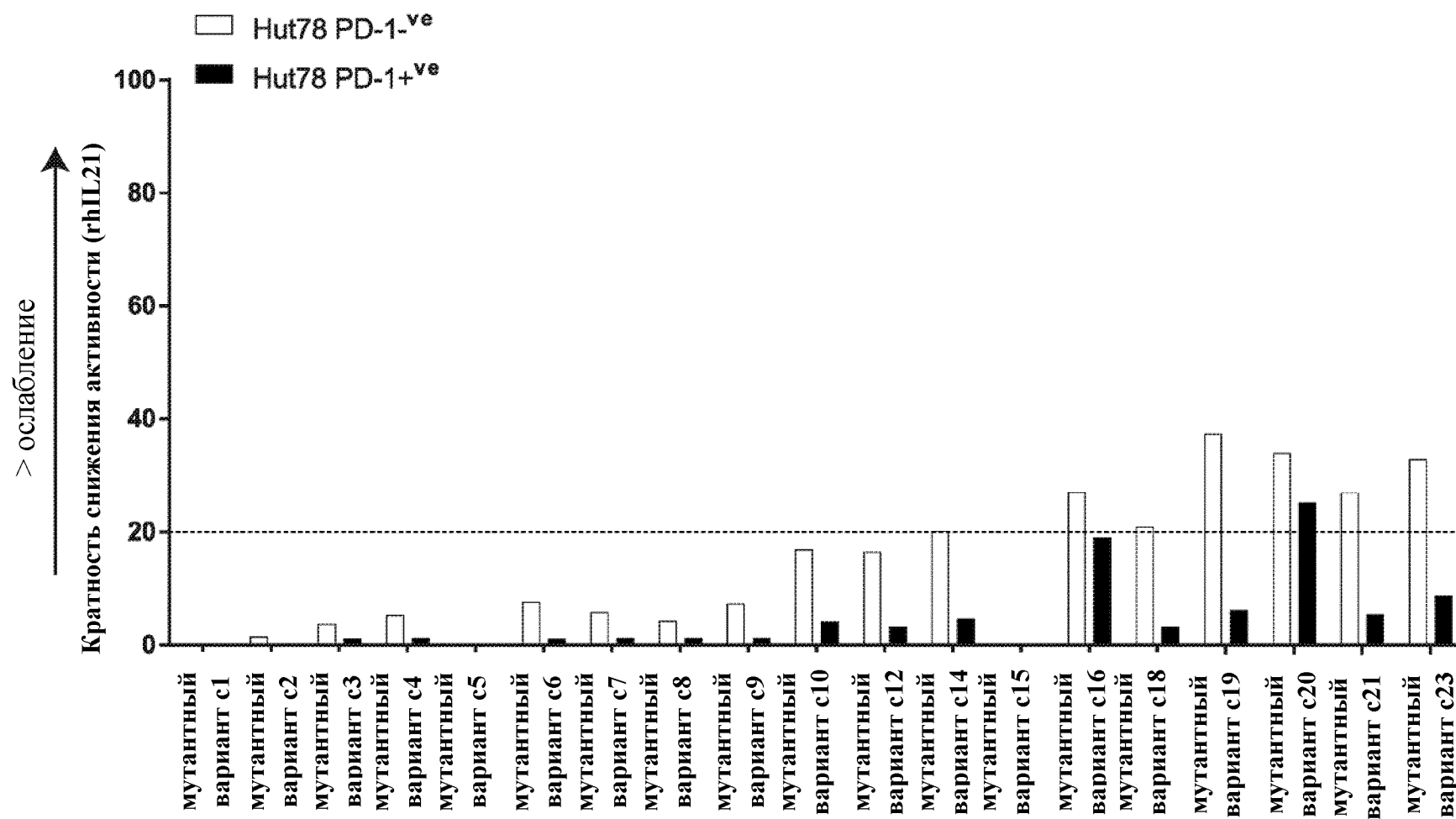
Фиг. 7



Мутеины, разработанные таким образом, что они характеризуются сниженным связыванием с IL-21R $\alpha$

Целевые мутеины с > 20x снижением эффективности по сравнению с rhIL21 в клетках PD1<sup>-ve</sup>

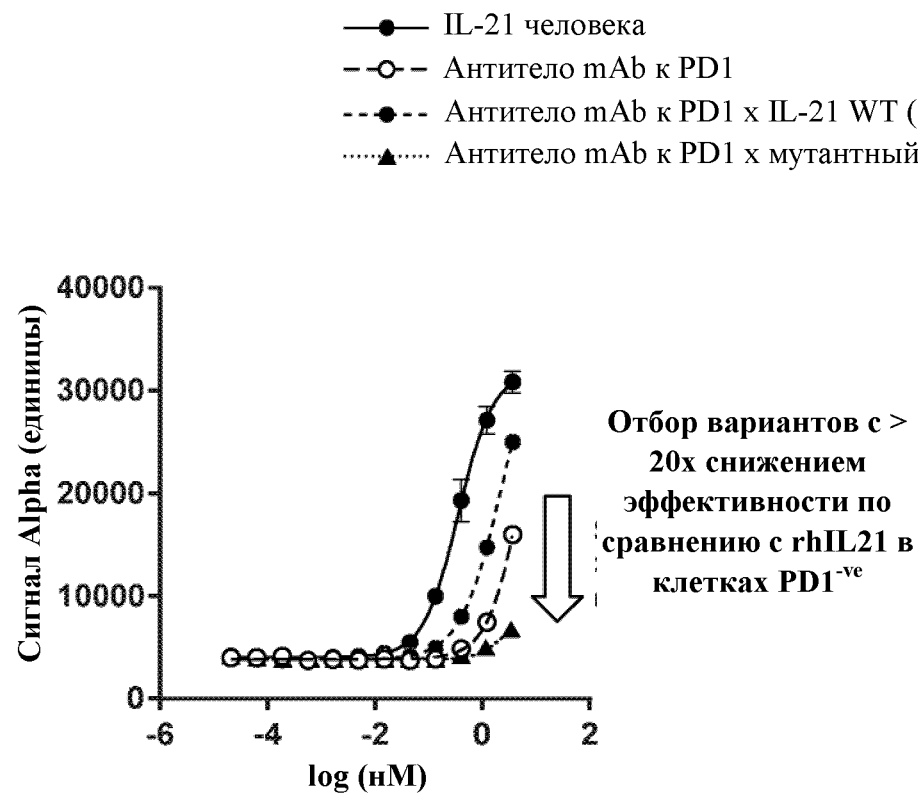
Фиг. 8



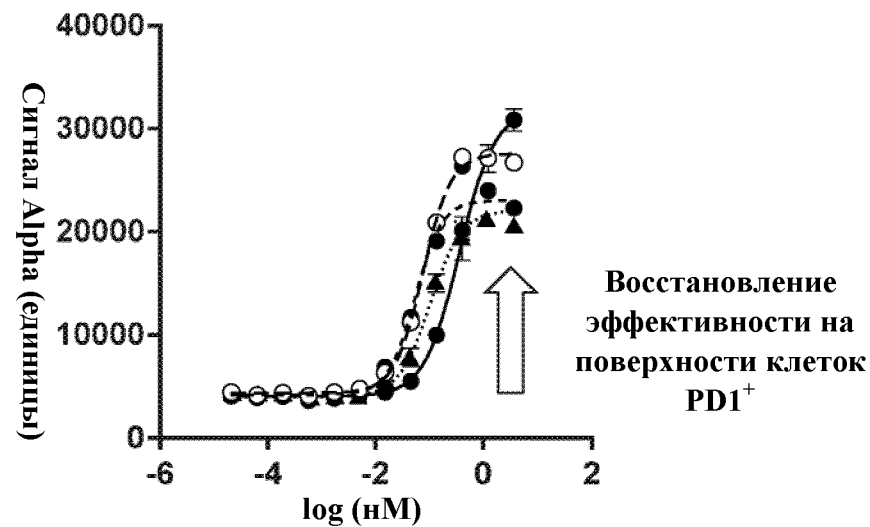
Мутеины, разработанные таким образом, что они характеризуются сниженным связыванием с IL-21R $\gamma$   
 3,7 нМ слитого белка/rhIL-21



Идентификация мутеинов, которые соответствуют критериям ( $> 20$ -кратное ослабление на поверхности клеток PD-1<sup>-ve</sup>) и зависят от PD-1 при нацеливании

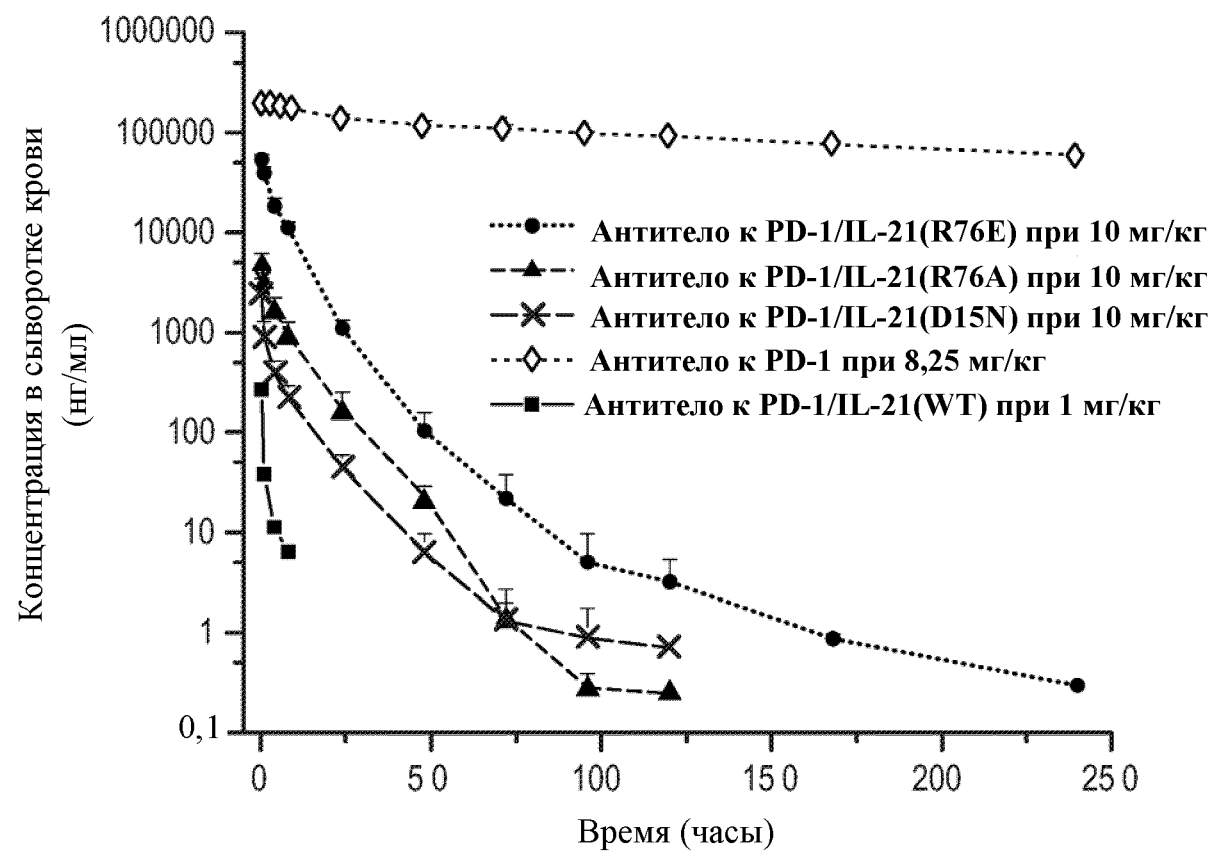


Фиг. 9А  
PD1<sup>-ve</sup>



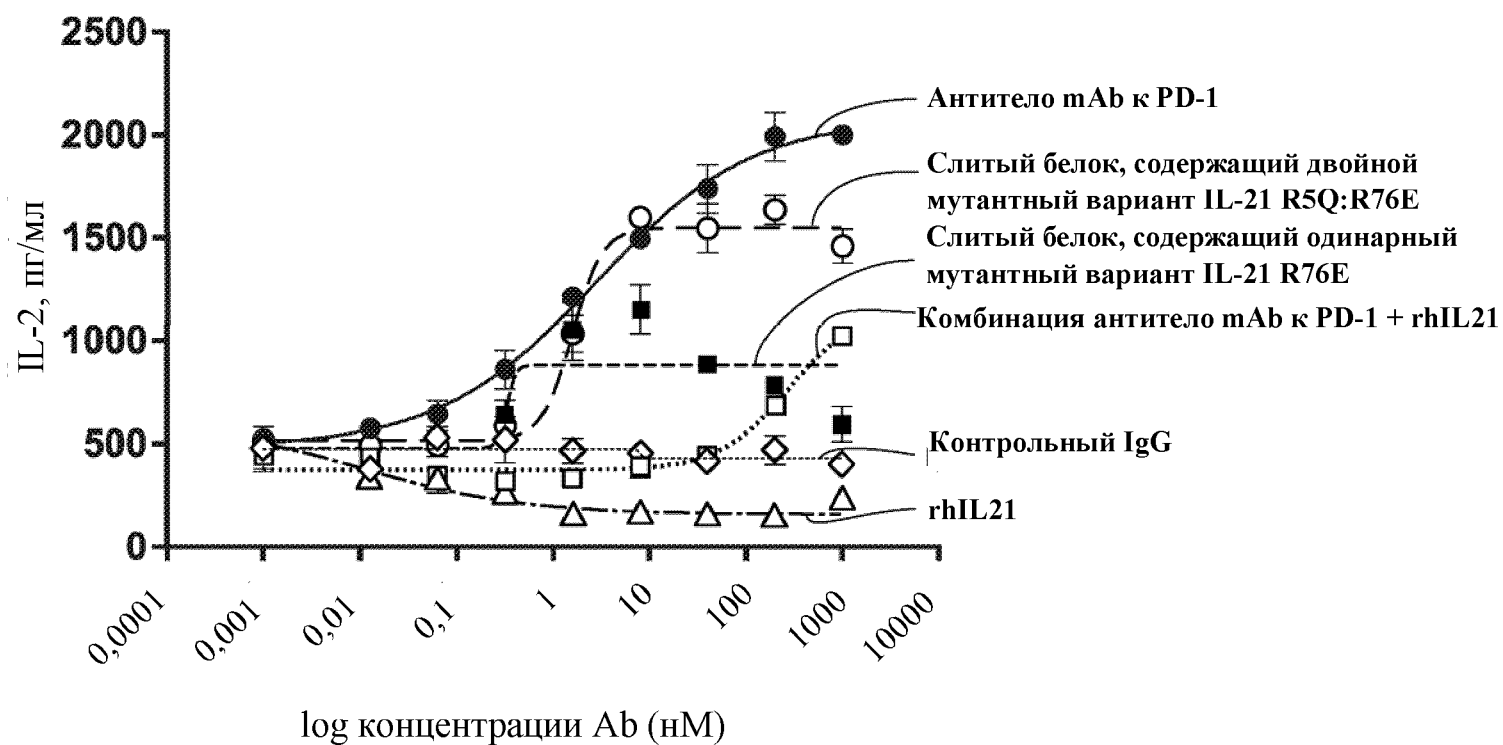
Фиг. 9В  
PD1<sup>+ve</sup>

Фиг. 10



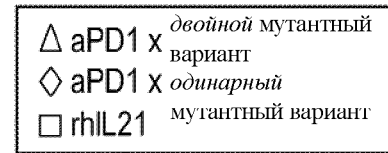
Слитые белки антитело mAb к PD-1/мутеин IL-21 демонстрируют изменение распределения по сравнению с исходными антителами mAb к PD-1

Фиг. 11



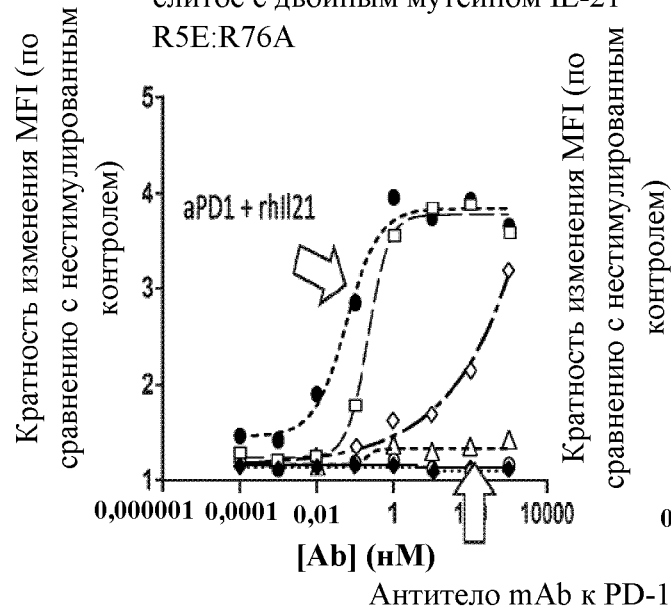
MLR – день 3

Фиг. 12



ФИГУРА 12А:

Сплошная линия = слитый белок, содержащий антитело mAb к PD-1, слитое с двойным мутеином IL-21 R5E:R76A

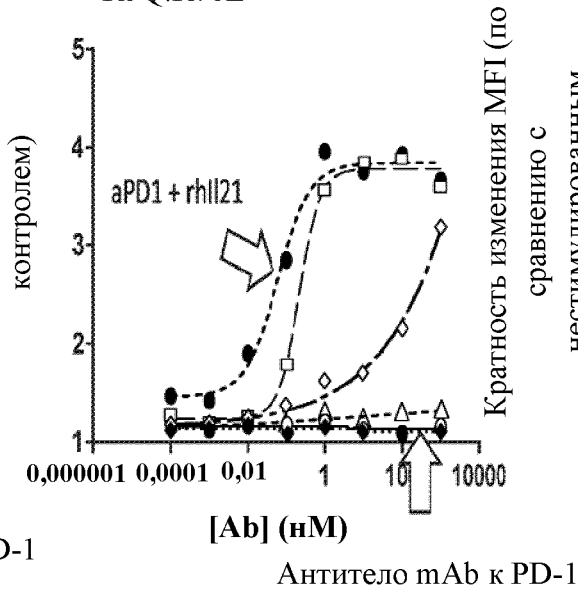


**pSTAT3**

CTL находились в состоянии покоя в течение 48 ч. перед 10-минутной стимуляцией  
Базальный уровень PD1 является низким после 24 ч. периода покоя

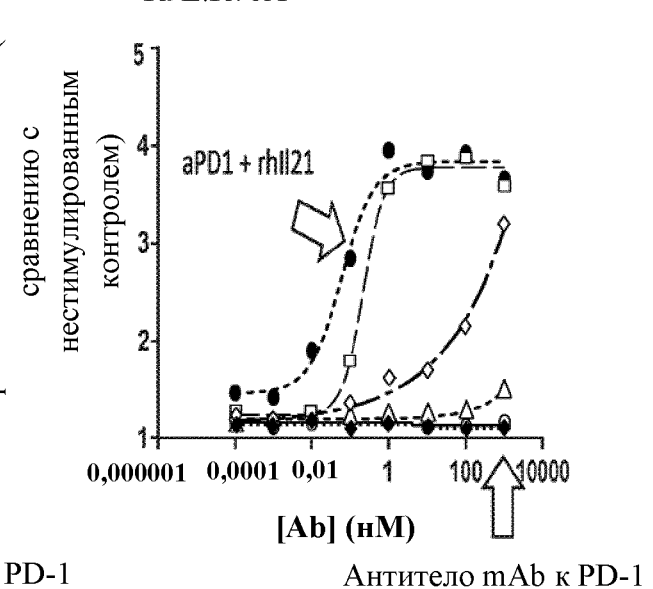
ФИГУРА 12В:

Сплошная линия = слитый белок, содержащий антитело mAb к PD-1, слитое с двойным мутеином IL-21 R5Q:R76E

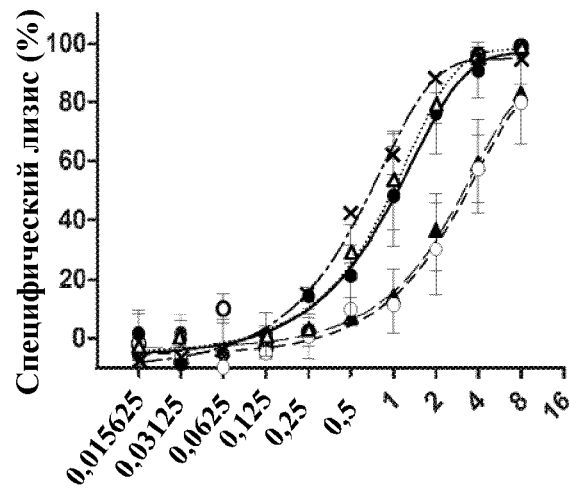


ФИГУРА 12С:

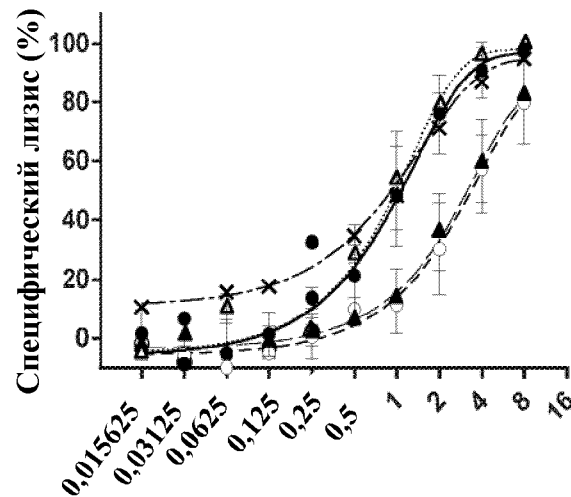
Сплошная линия = слитый белок, содержащий антитело mAb к PD-1, слитое с двойным мутеином IL-21 R9E:R76A



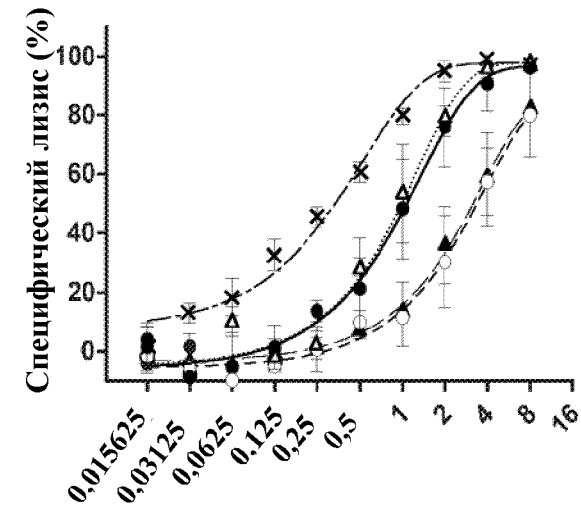
- rhIL21
- hlgG4
- ▲— Антитело mAb к PD-1
- .....Δ..... Комбинация антитело mAb к PD-1 + rhIL21
- ×— Слитый белок на основе двойного мутеина IL-21 (см. под каждым графиком)



**Фиг. 13А**  
Двойной мутеин = IL21  
R5E/R76A

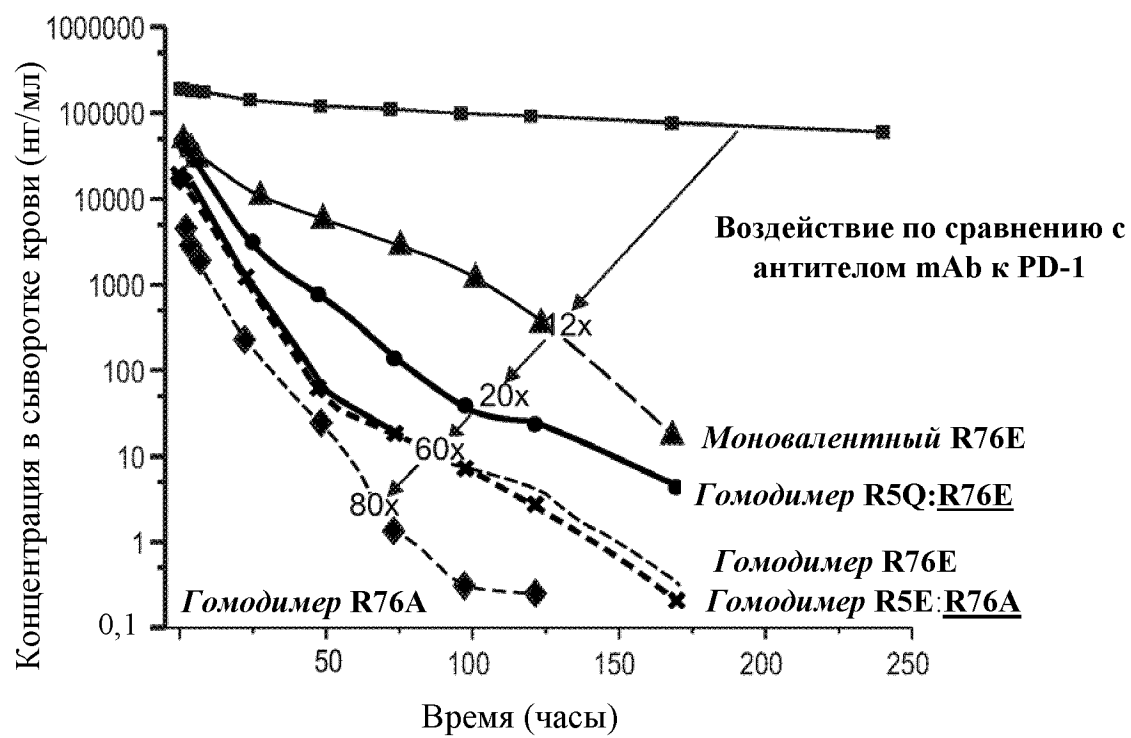


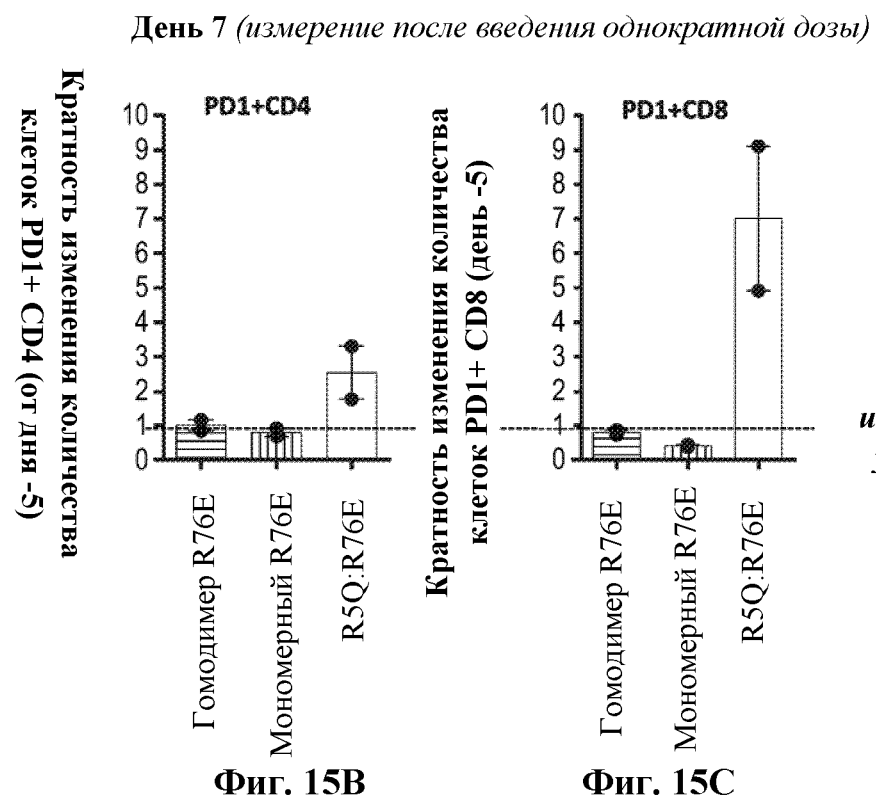
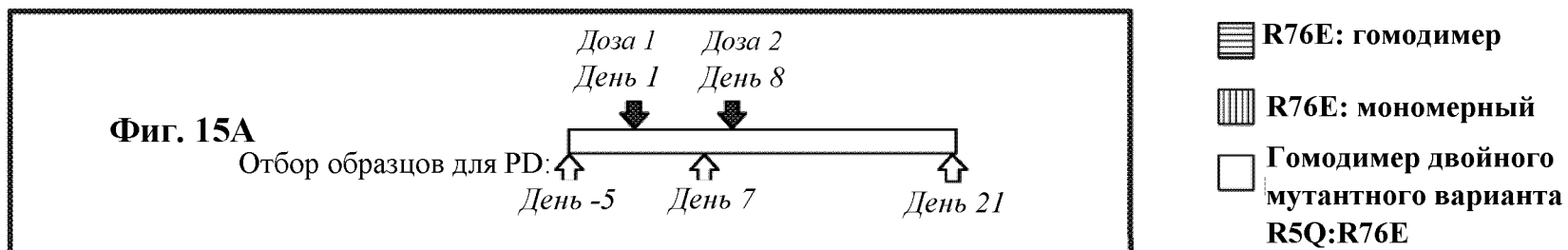
**Фиг. 13В**  
Двойной мутеин = IL21  
R5Q/R76E



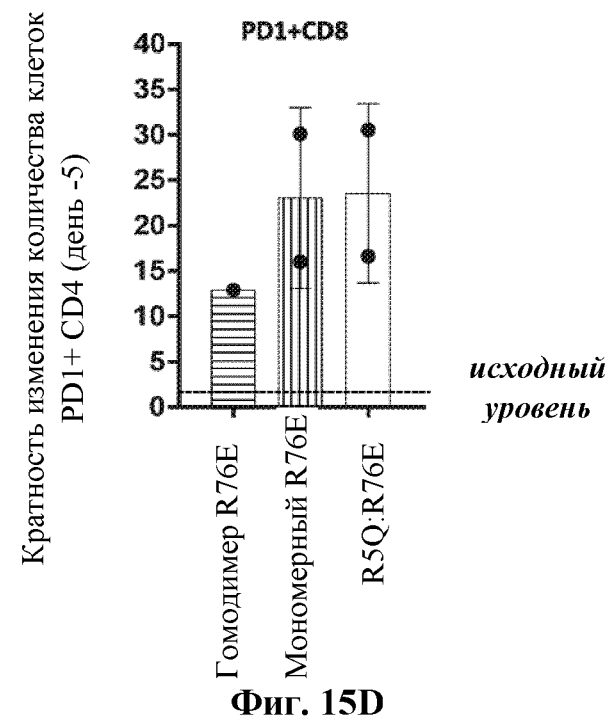
**Фиг. 13С**  
Двойной мутеин = IL21  
R9E/R76A

Фиг. 14



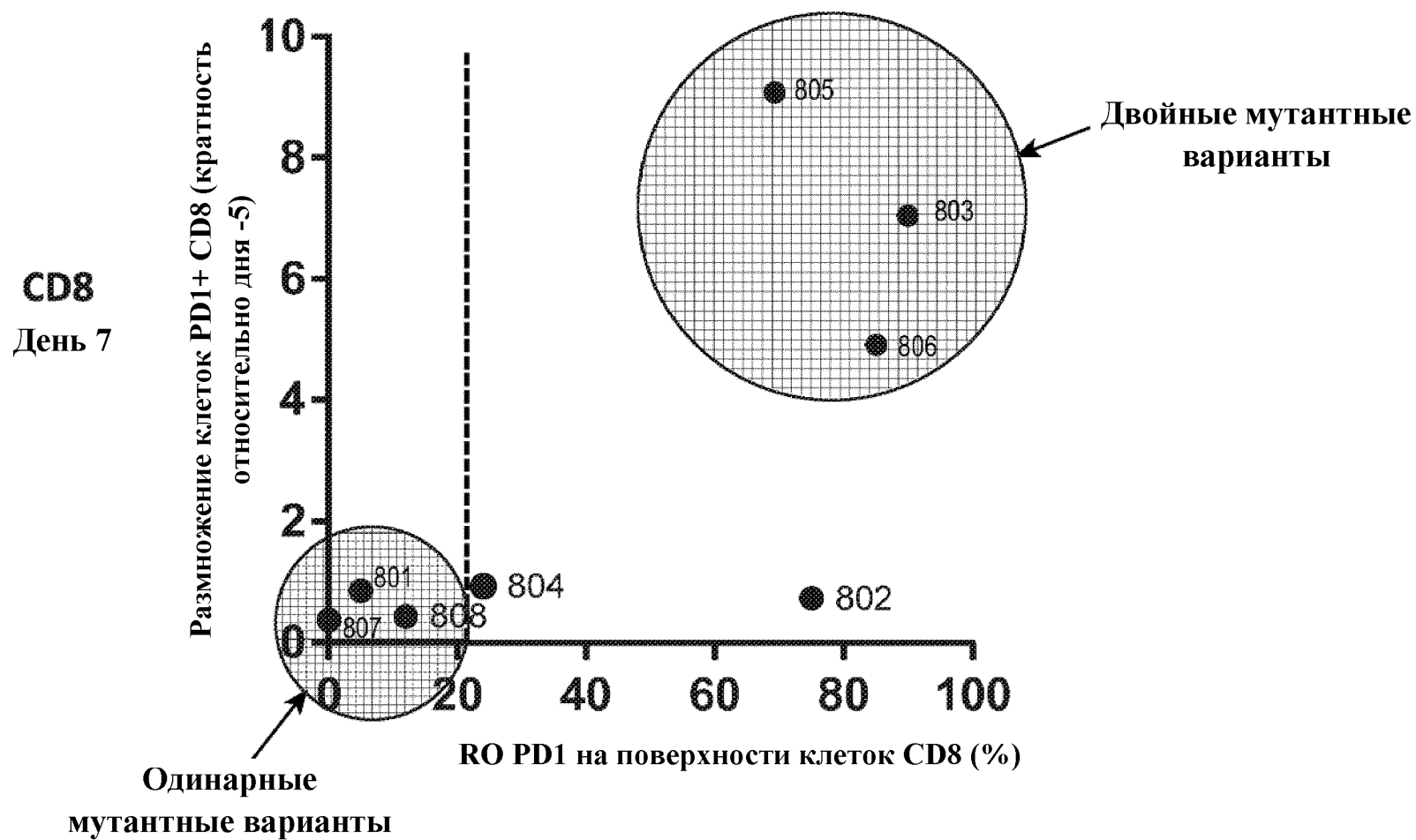


**День 21** (измерение через 14 дней после введения повторной дозы)



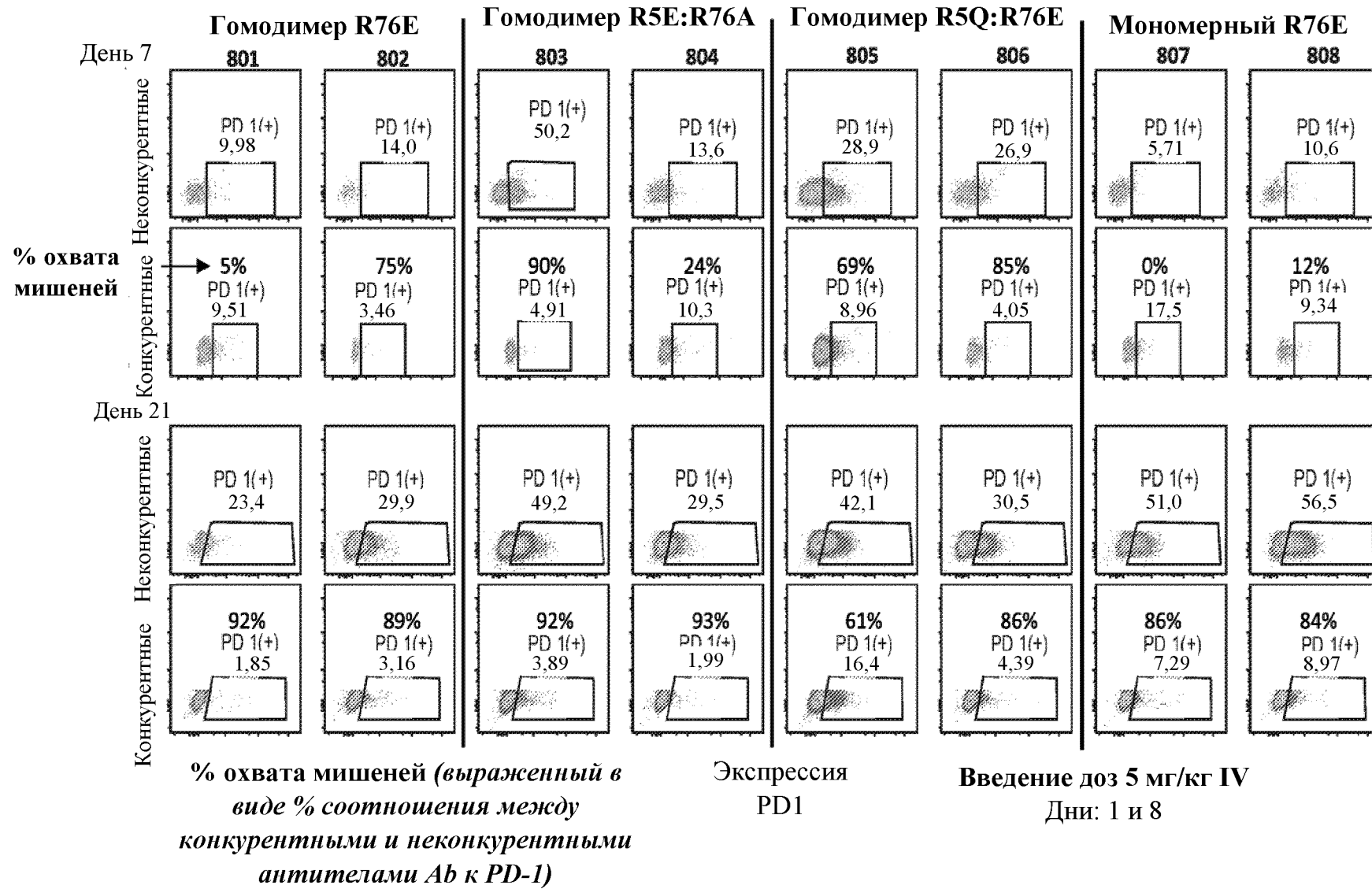
Фиг. 16

День 7 (зависимость размножения Т-клеток PD1+ от занятости рецепторов)

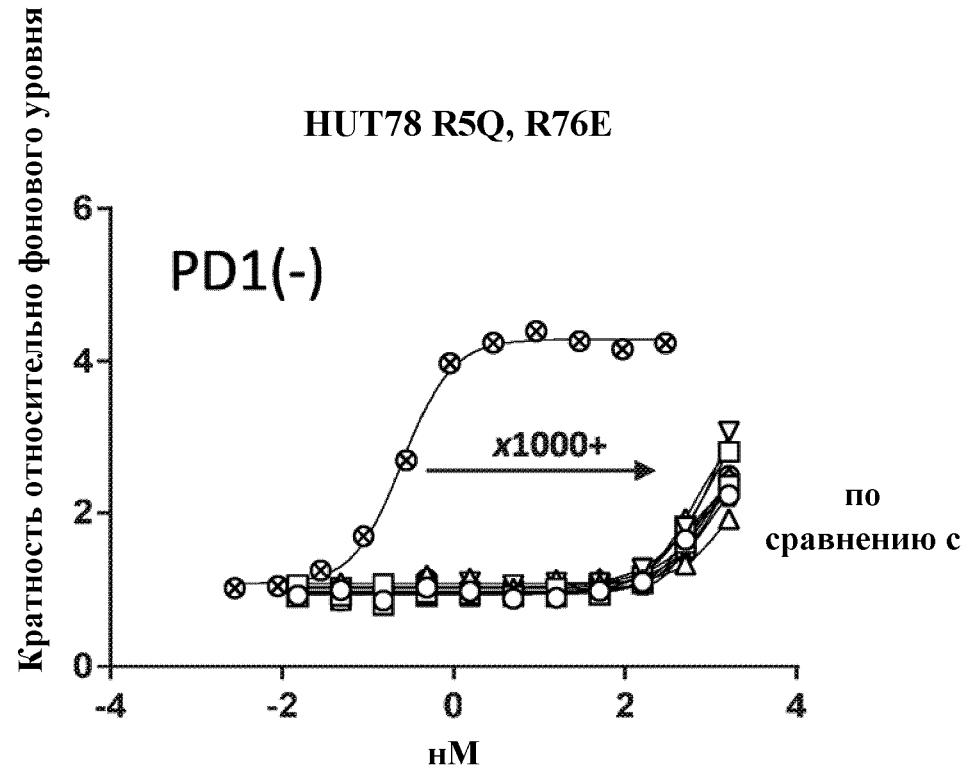




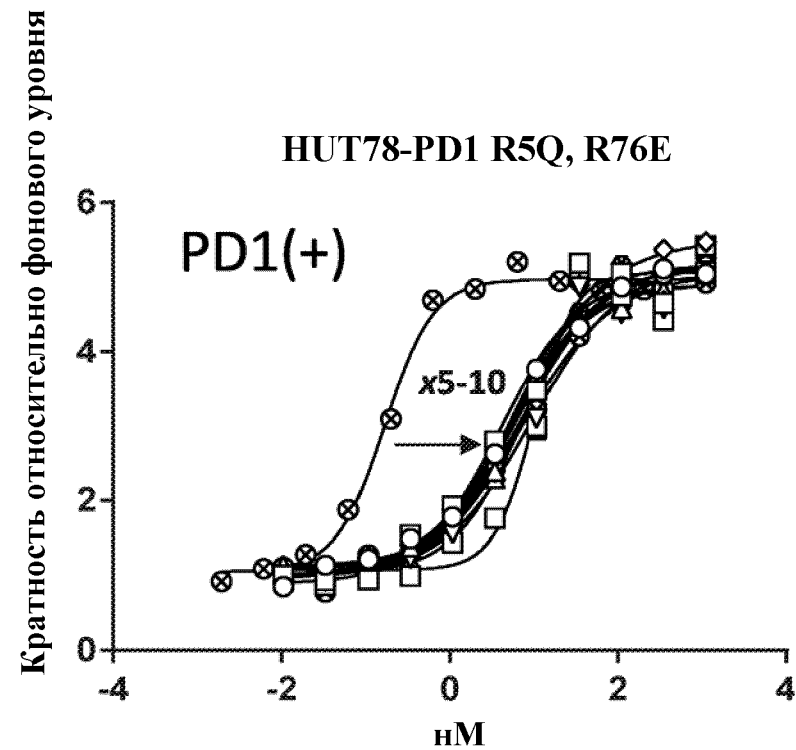
Фиг. 17



Нацеливание на PD-1 необходимо для передачи сигнала с помощью pSTAT3, активность мутеинов является сходной среди различных вариантов антител mAb к PD-1

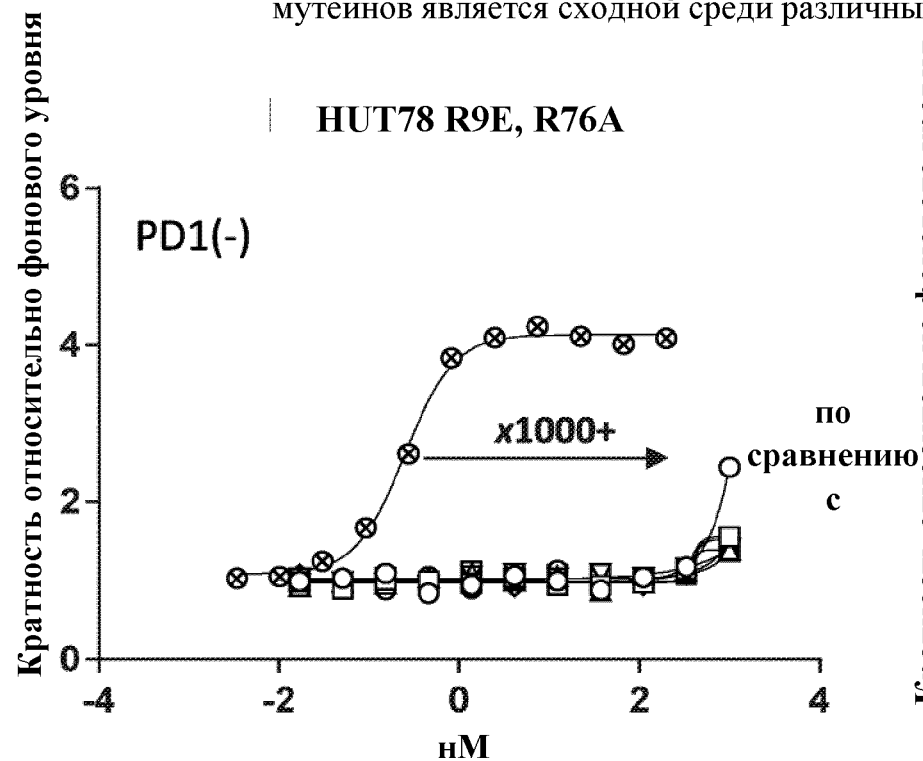


Фиг. 18А

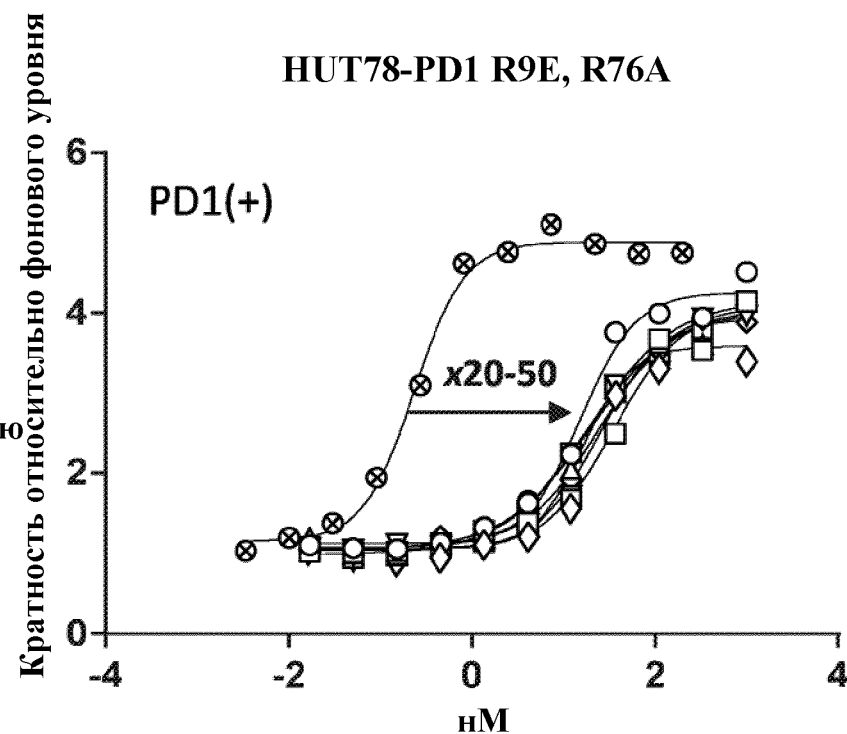


Фиг. 18В

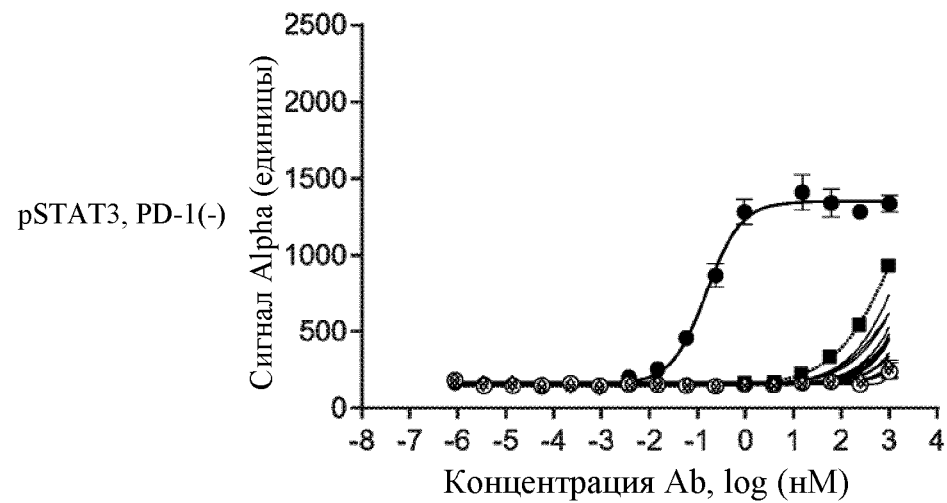
Нацеливание на PD-1 необходимо для передачи сигнала с помощью pSTAT3, активность мутеинов является сходной среди различных вариантов антител mAb к PD-1



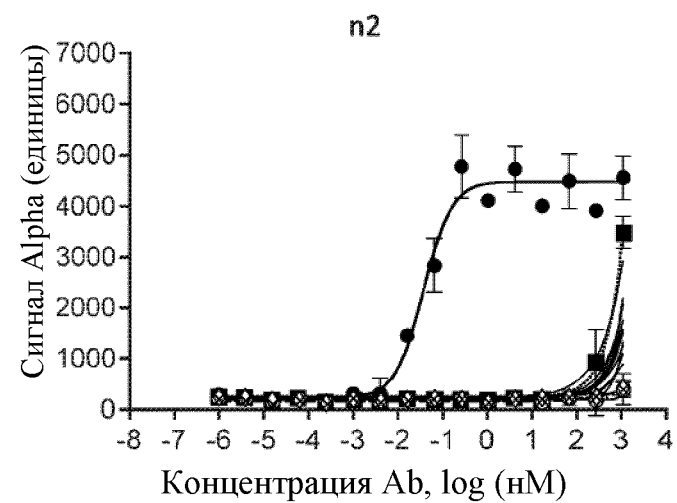
Фиг. 19А



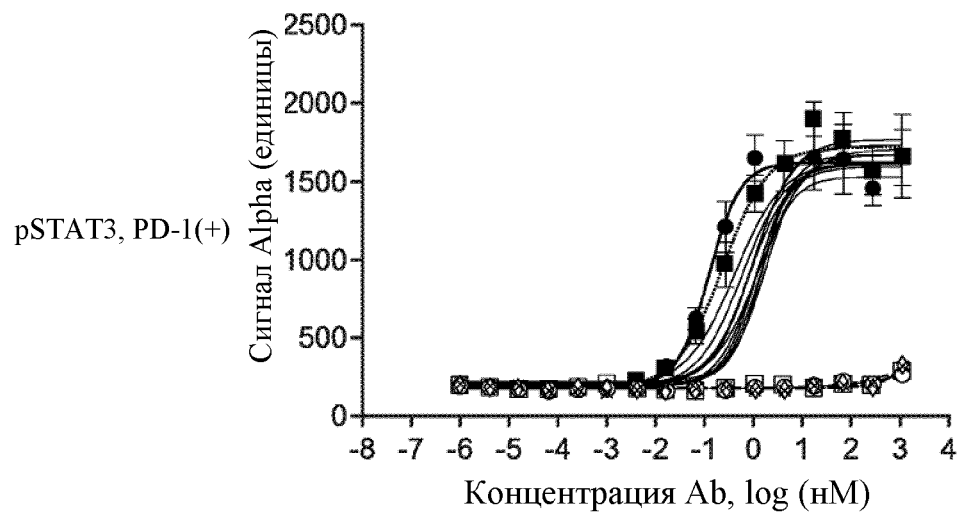
Фиг. 19В



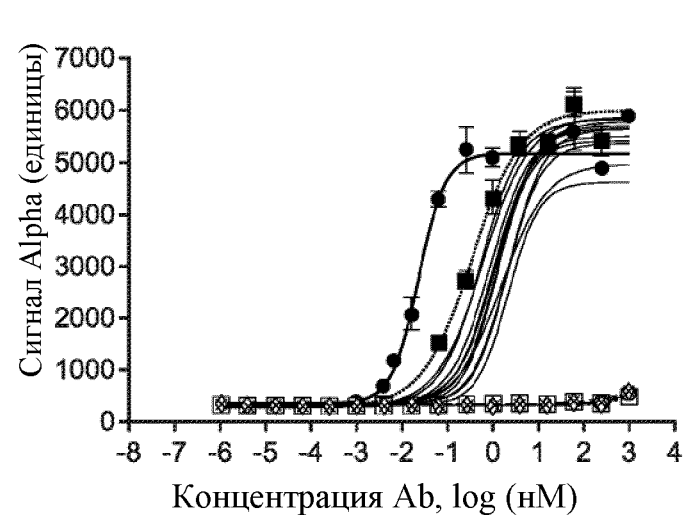
Фиг. 20А



Фиг. 20В

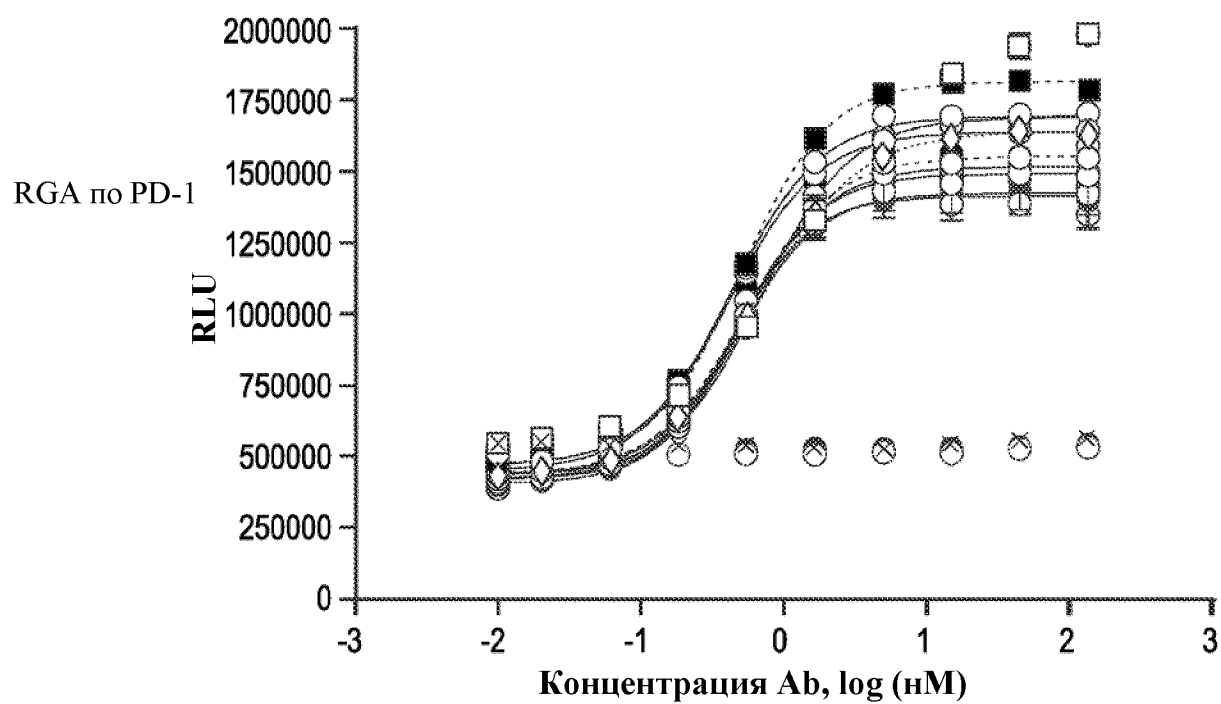


Фиг. 20С

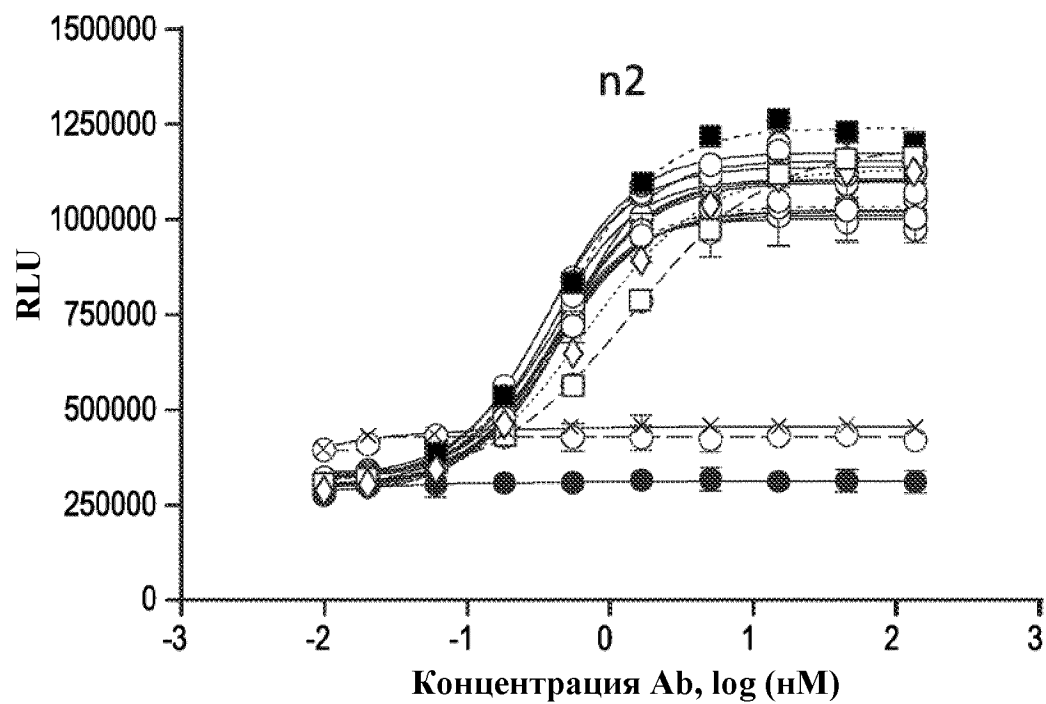


Фиг. 20D

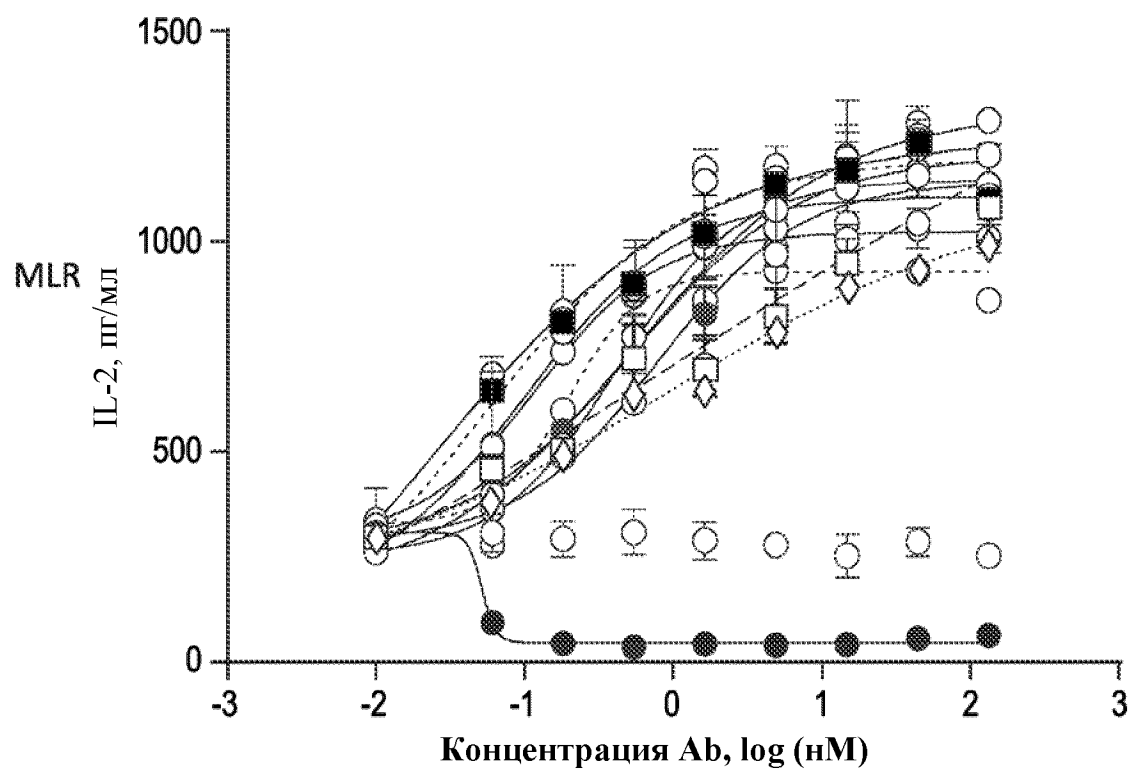
Фиг. 21А



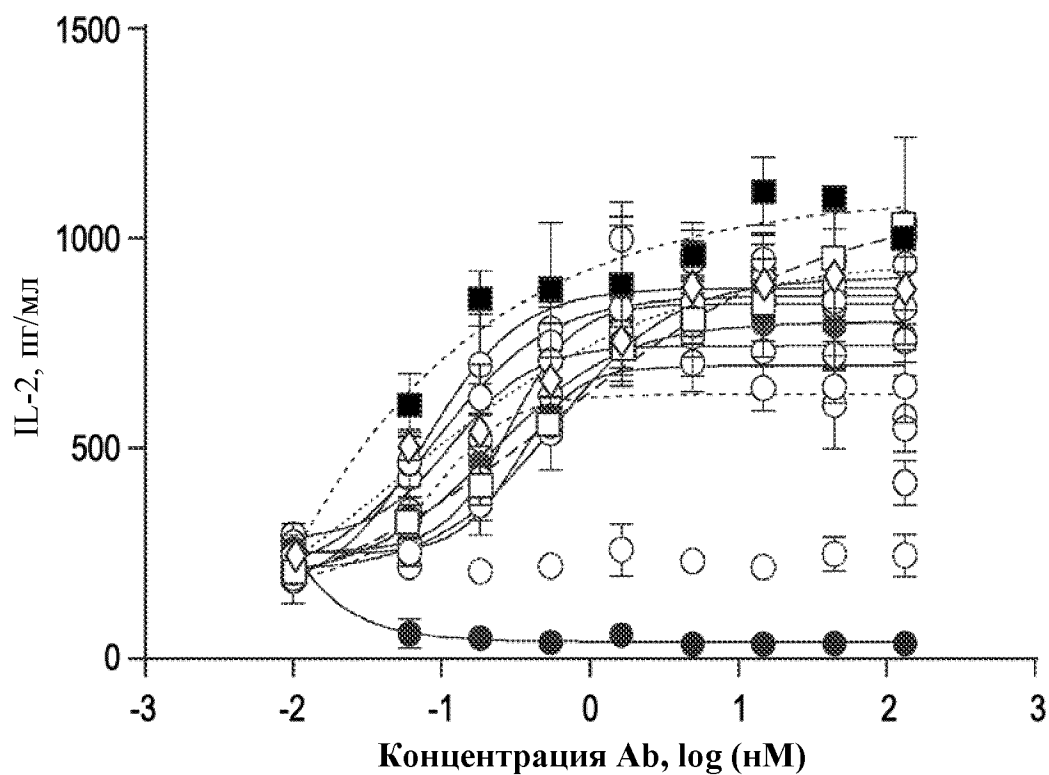
Фиг. 21В



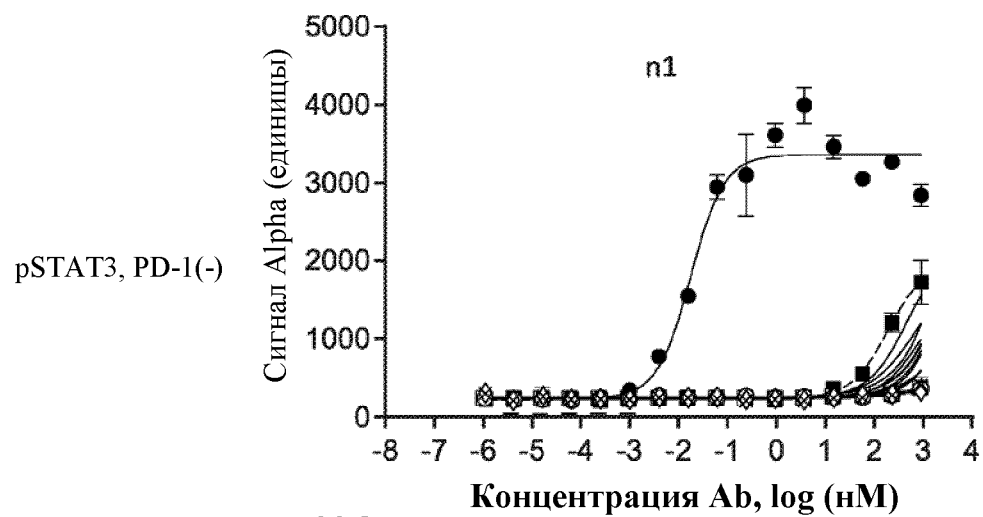
Фиг. 21С



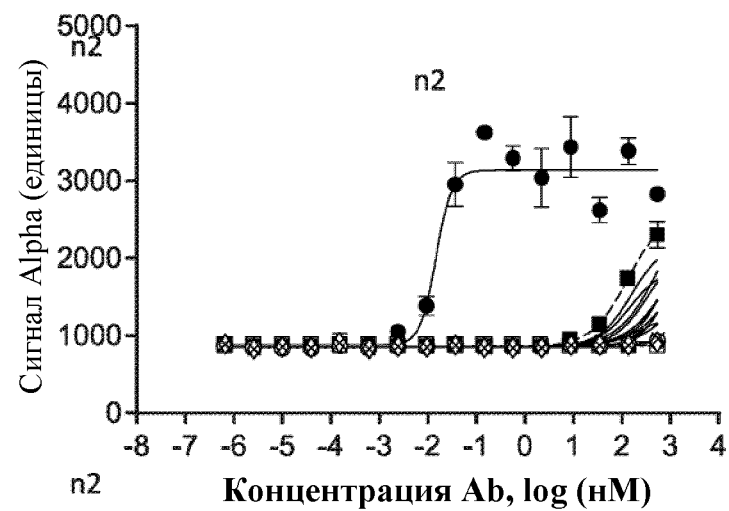
Фиг. 21D



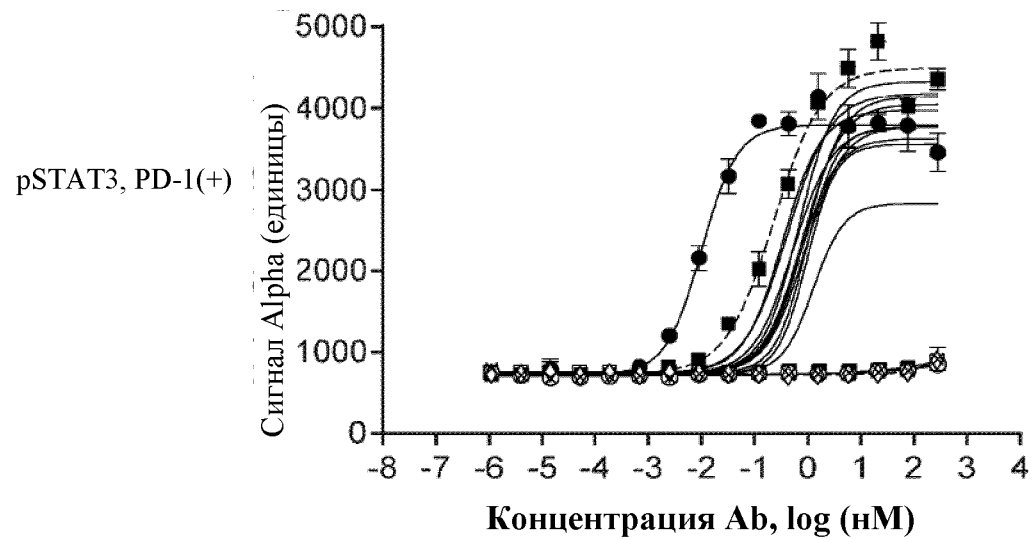
Фиг. 22А



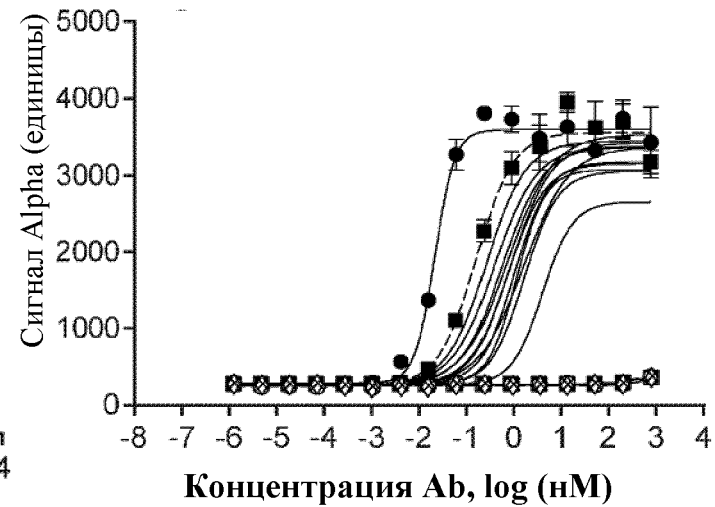
Фиг. 22В



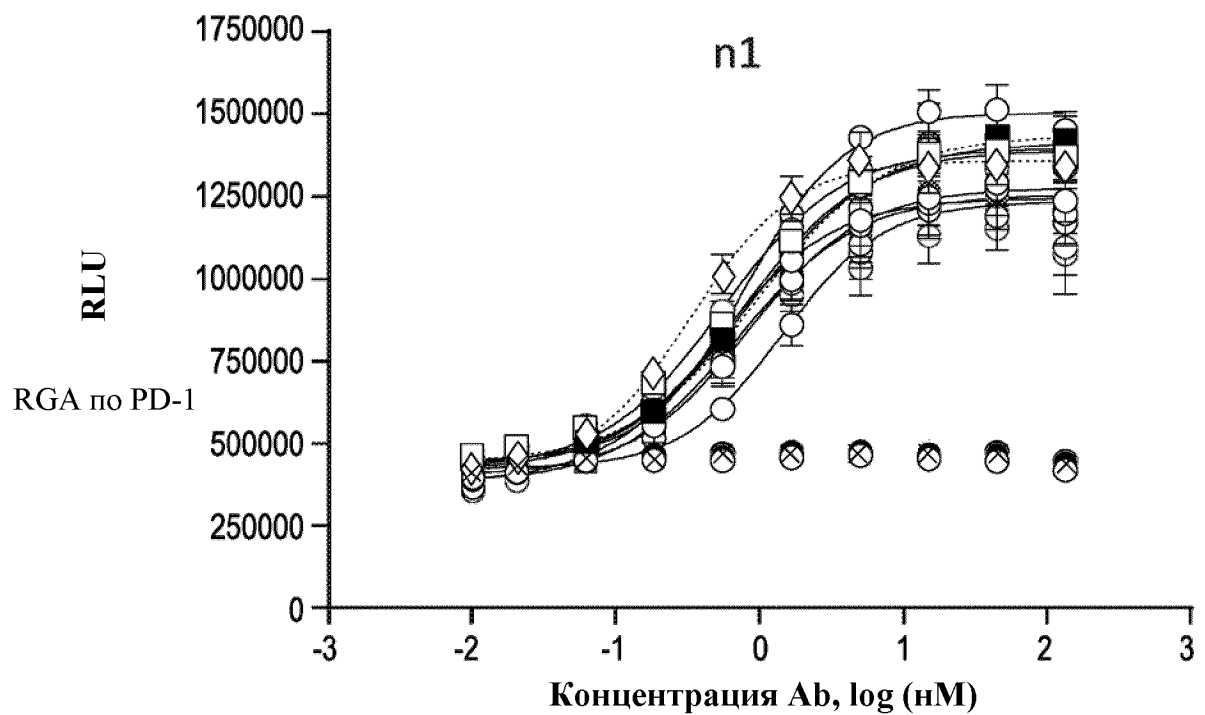
Фиг. 22С



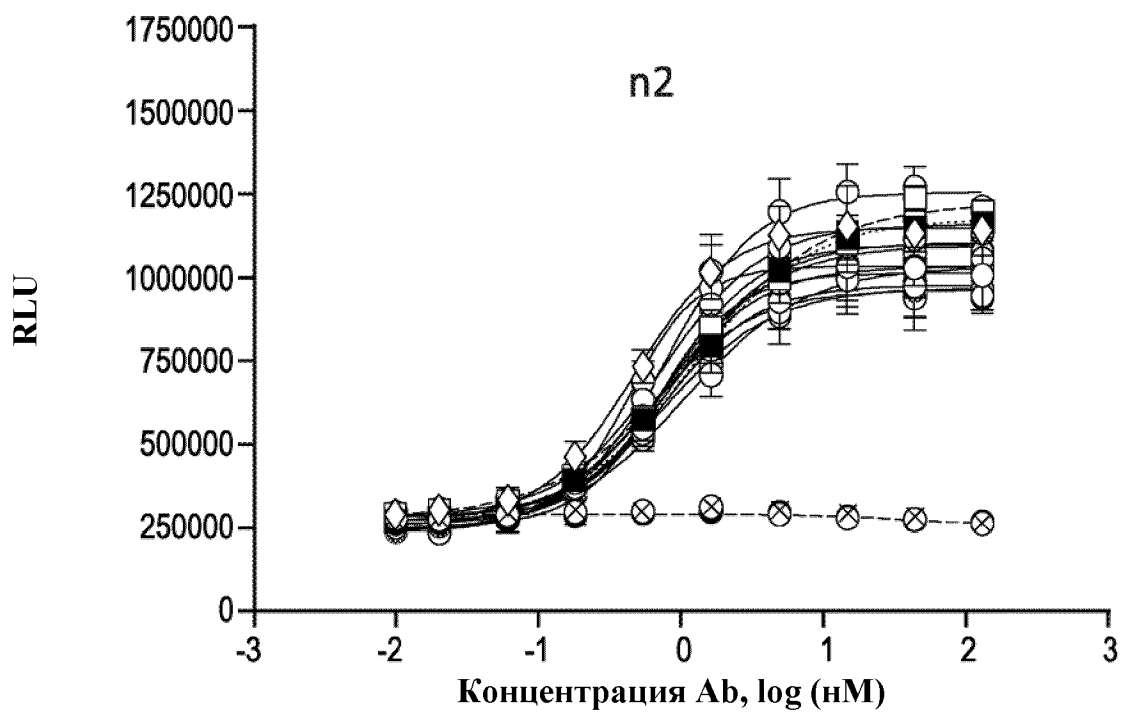
Фиг. 22Д



Фиг. 23А

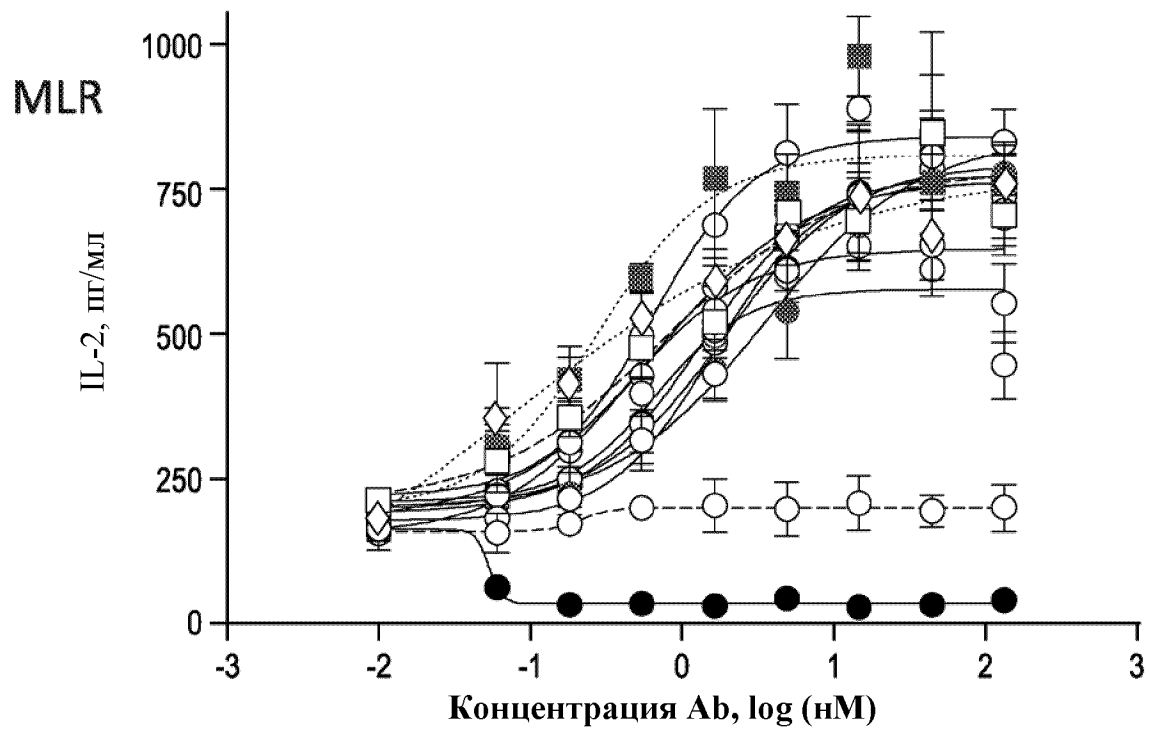


Фиг. 23В

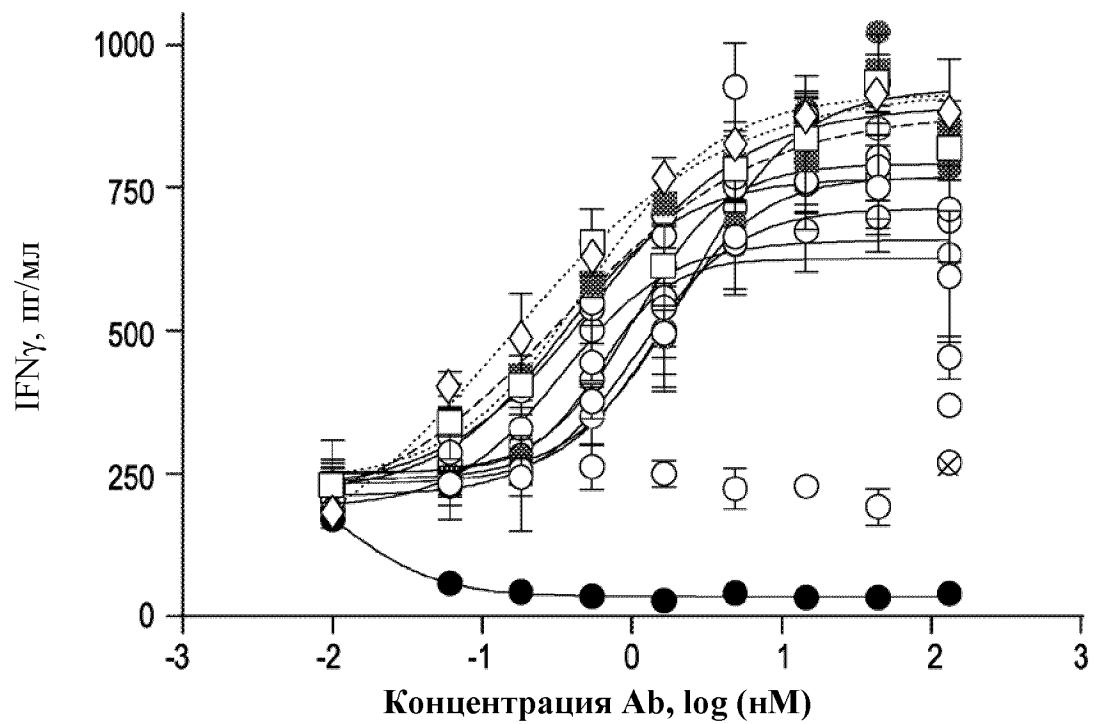




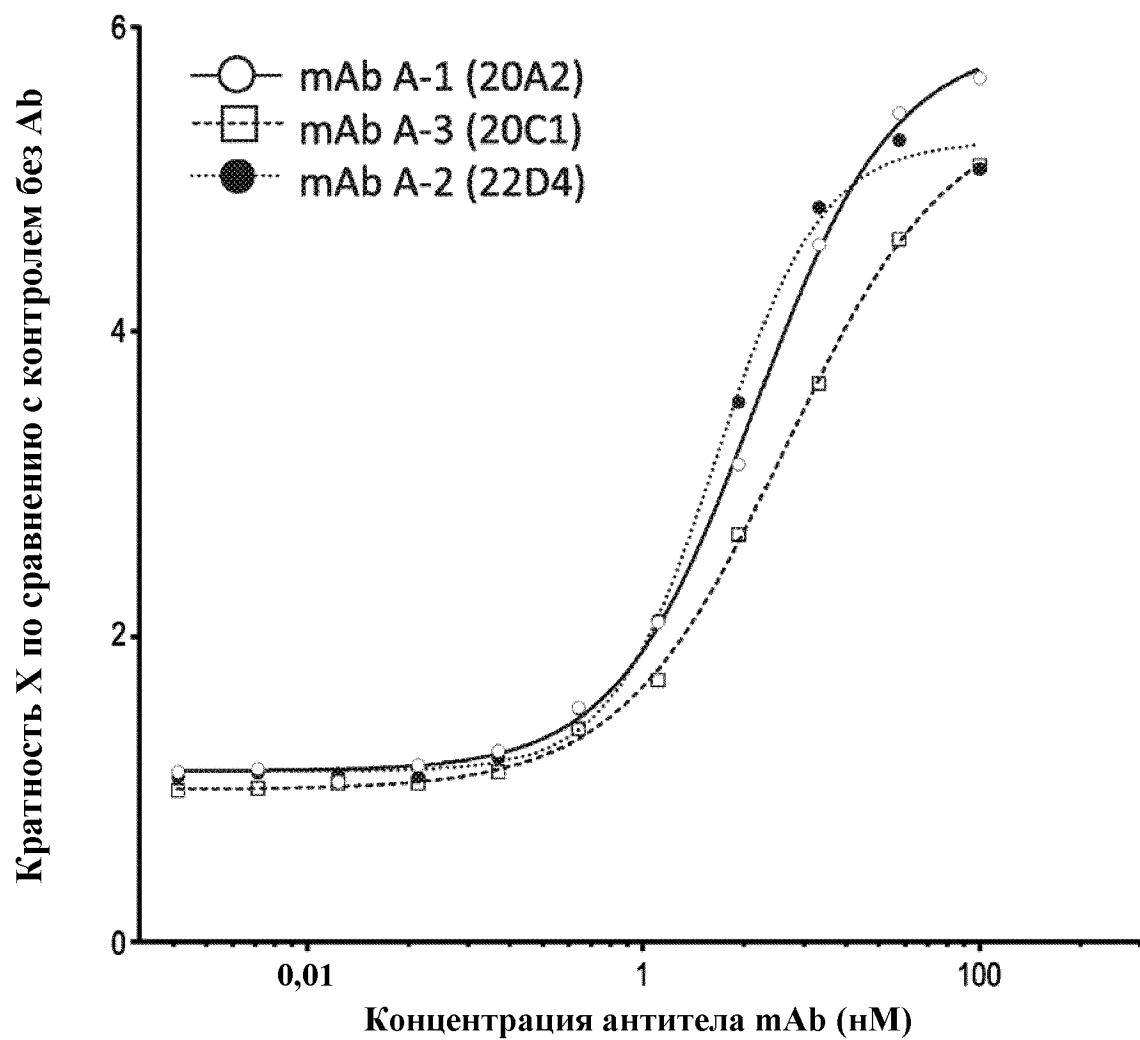
Фиг. 23С



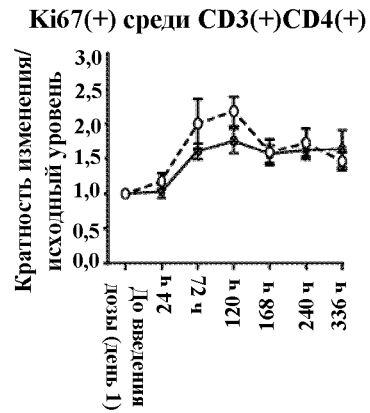
Фиг. 23D



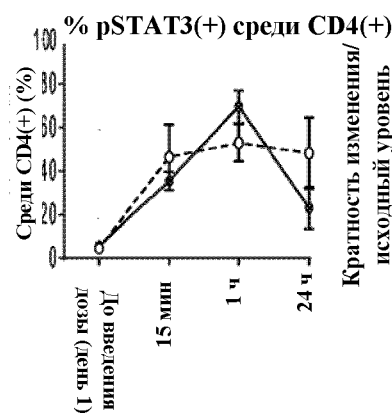
Фиг. 24



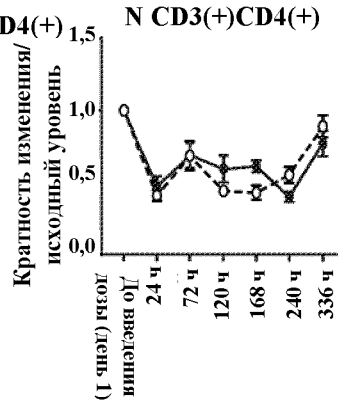
Фиг. 25А



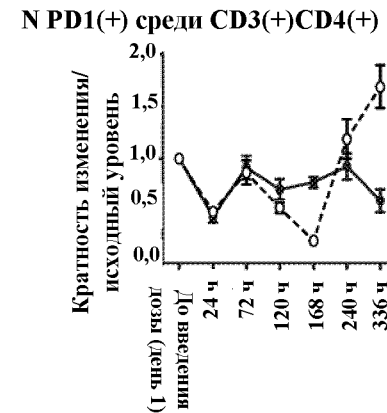
Фиг. 25С



Фиг. 25Е

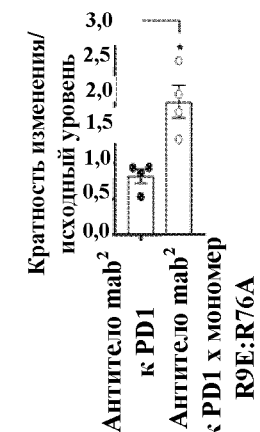


Фиг. 25G

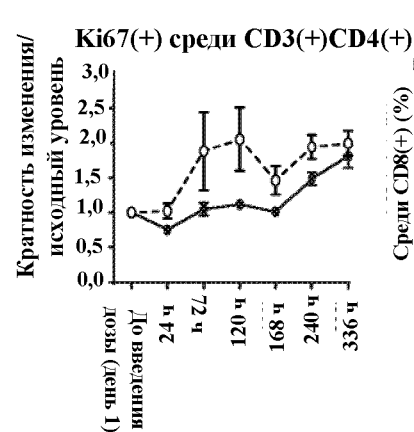


Фиг. 25I

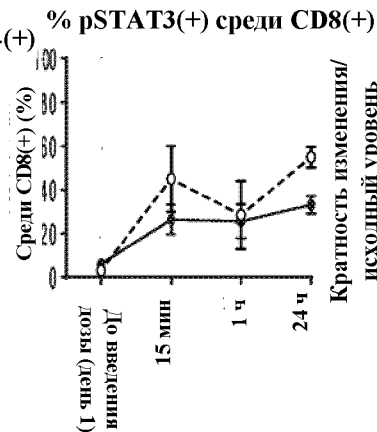
Перфорин сыворотки крови (72 ч)



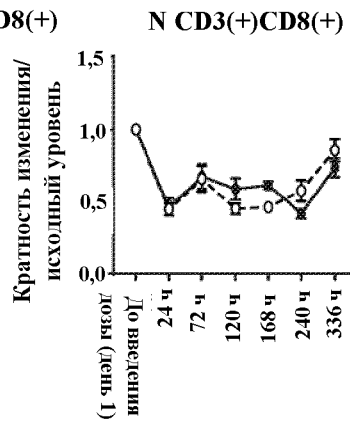
Фиг. 25В



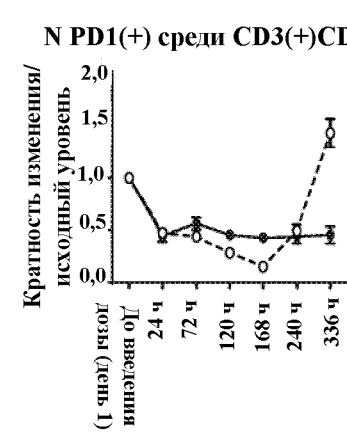
Фиг. 25D



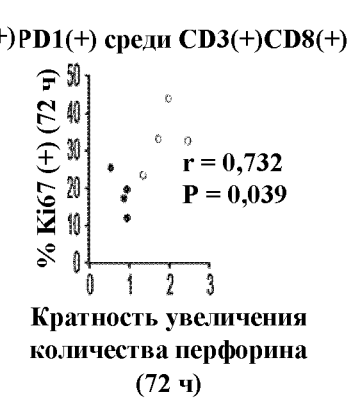
Фиг. 25F



Фиг. 25H



Фиг. 25J

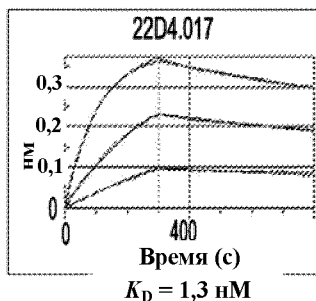


--○-- [22D4.017]-[R9E:R76A] (мономер)  
—●— [22D4.017]

huPD1(1-170)-  
Flag-His

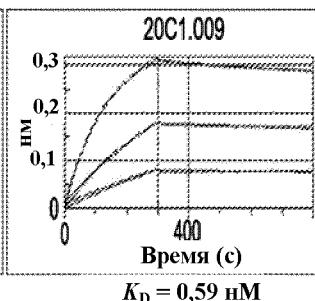
ФИГ. 26А

Антитело Ab 22D4.017 к huPD-1



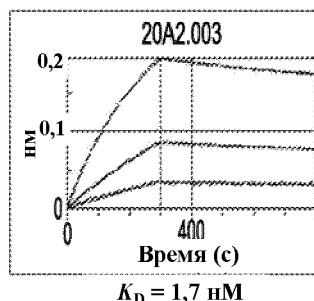
ФИГ. 26В

Антитело Ab 20C1.009 к huPD-1



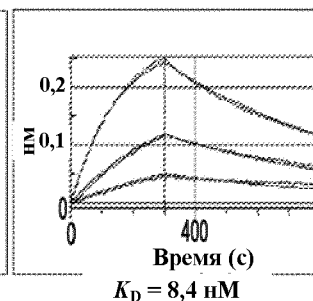
ФИГ. 26С

Антитело Ab 20A2.003 к huPD-1



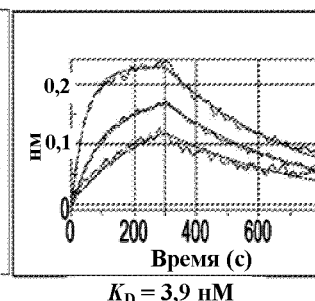
ФИГ. 26D

Антитело mAb IgG1 к PD-1



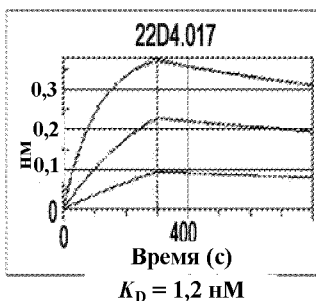
ФИГ. 26Е

Антитело mAb IgG4 к PD-1



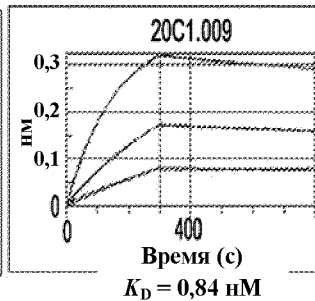
ФИГ. 26F

Антитело Ab 22D4.017 к huPD-1



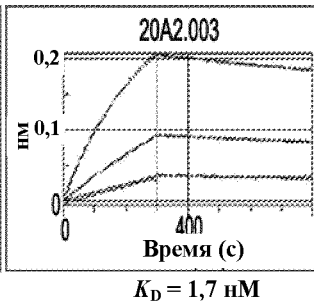
ФИГ. 26G

Антитело Ab 20C1.009 к huPD-1



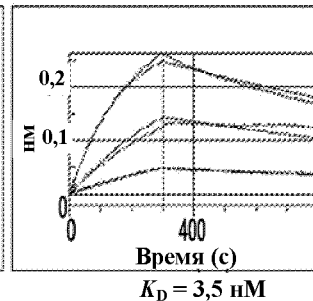
ФИГ. 26H

Антитело Ab 20A2.003 к huPD-1



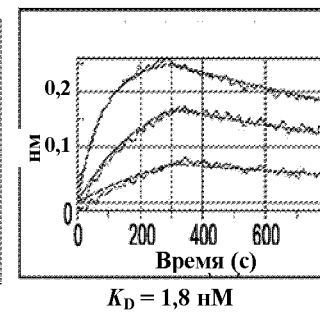
ФИГ. 26I

Антитело mAb IgG1 к PD-1



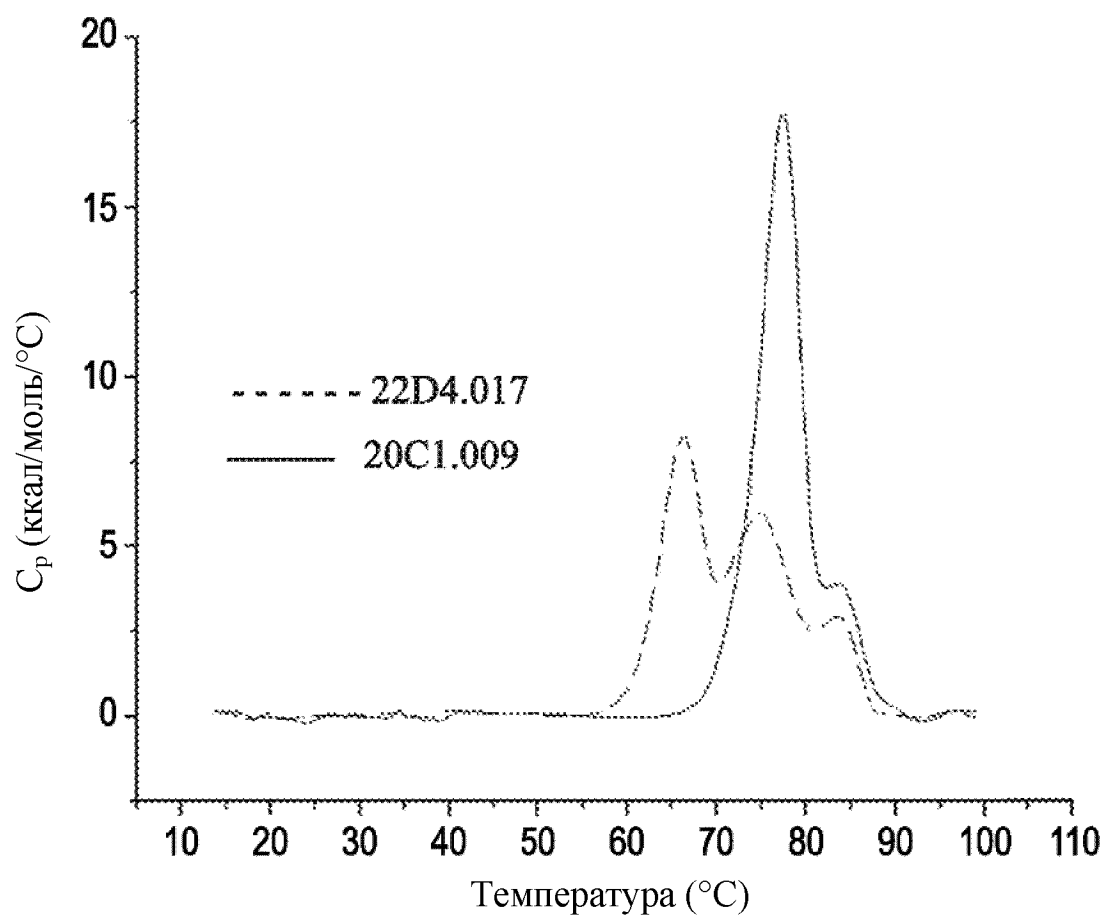
ФИГ. 26J

Антитело mAb IgG4 к PD-1

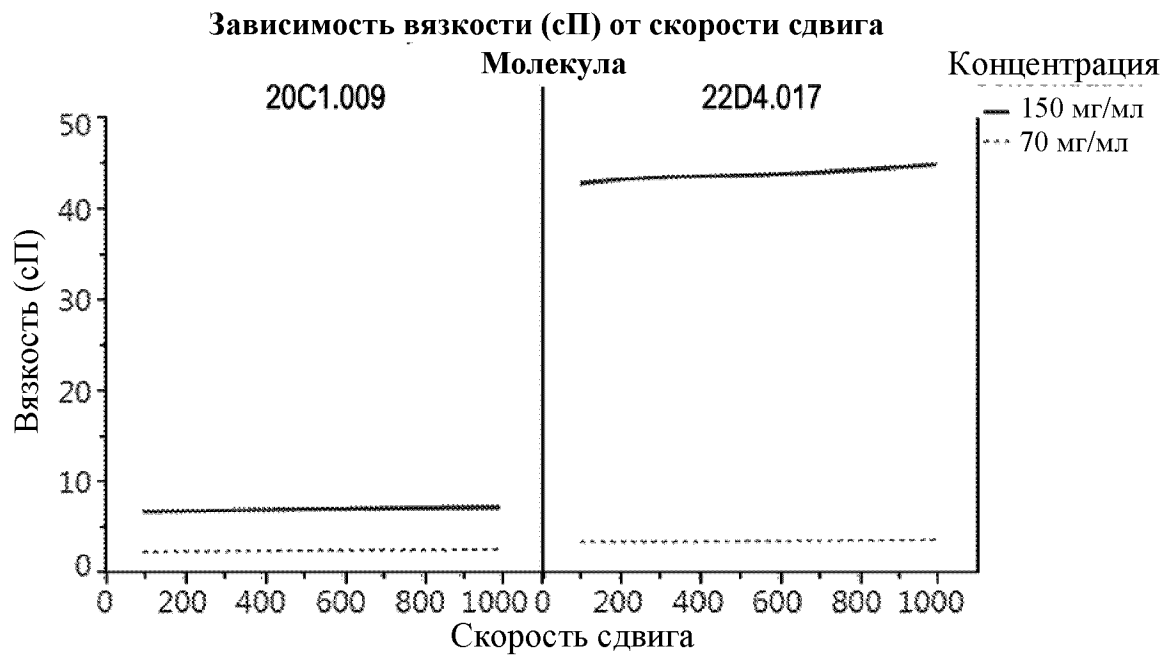


суперPD1(1-167)-  
Flag-His

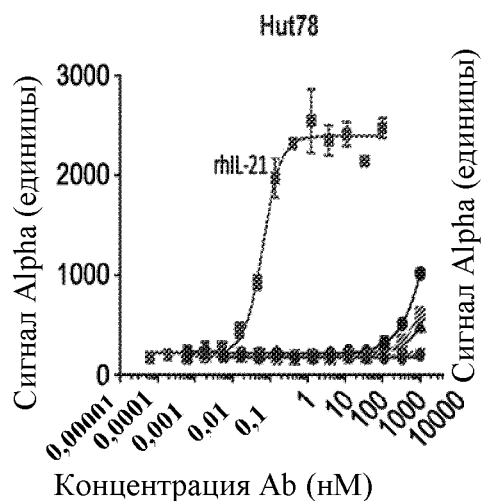
Фиг. 27



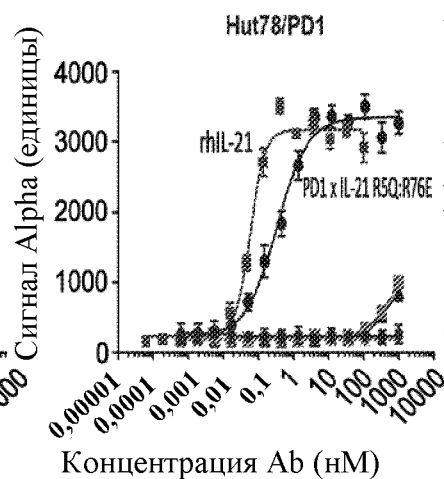
Фиг. 28



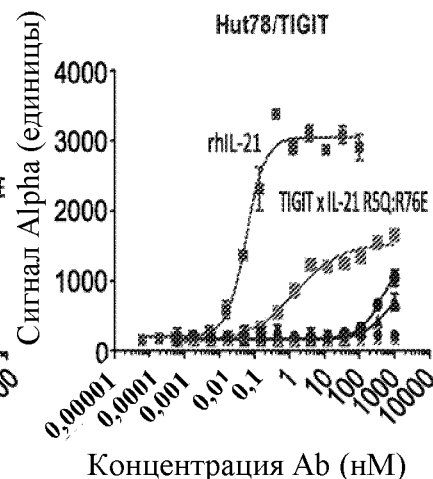
Фиг. 29А



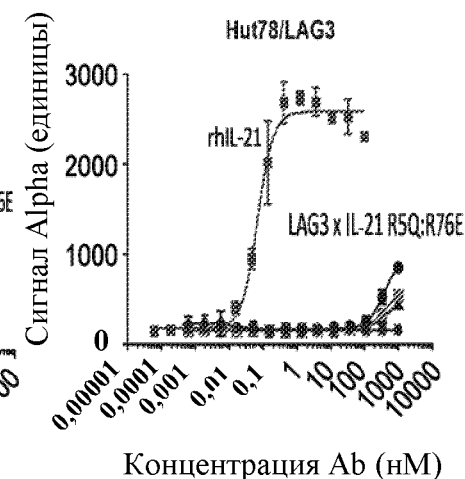
Фиг. 29В



Фиг. 29С



Фиг. 29D



Сконструированные линии Т-клеток Hut78, экспрессирующие PD-1, TIGIT либо LAG3

